وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR –ANNABA- UNIVERSITY
UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR –ANNABA-



جامعة باجي مختار
-عنابة-

FACULTÉ DES SCIENCES

Département de Chimie

Année 2007

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur

En Chimie

THEME

POLYPHÉNOLS DES SARMENTS ET DES RAFLES DE LA VIGNE (*VITIS VINIFERA* L.) ET DU VIN, PURIFICATION, DOSAGE ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

Par

Mme AMIRA-GUEBAILIA HABIBA

Rapporteur :	**Mr Teguiche Mabrouk,**	**Pr.**	**Université de Guelma.**
Président :	**Mme Serridi Ratiba,**	**Pr.**	**Université de Annaba.**
Examinateurs :	**Mr Liacha Messaoud,**	**Pr.**	**Université de Annaba.**
	Mr Malek Rassoul,	**Pr.**	**Université d'Oum El Bouaghi.**
	Mr Akkal Salah,	**M/C**	**Université de Constantine.**
	Mr Mérillon Jean-Michel,	**Pr.**	**Université Bordeaux II, France.**

Soutenue publiquement le 26 Mai 2007

الملخص

في هذه الدراسة تم إستخلاص حوالي عشرون مركبا بوليفينوليا من عائلة الستيلبانات و الفلافونات, ثلاثة منها تعرف لأول مرة في نبتة الدالية (شجرة العنب) وهي " (-) ترانس ابسلون فنيفرين ,ترانس سيربوسين A ونبالانزينول B" وثلاثتها مشتقة من عنصر واحد هو " الرزفيراترول". الجزء الذي استعمل من هذه النبتة هو السيقان التي عرضت للتحليل بطريقة ذات مرحلتين تحليل تقسيمي طاردي مركزي(CPC) متبوعة بتحليل مائع ذي ضغط عال نصف تحضيري-semi (HPLC préparative). حددت الصيغ الكيميائية لهذه المركبات باستعمال الطرق الطيفية الكلاسيكية مثل الرنين لمغنطيسي النووي للهيدروجين (^{1}H RMN))والعلاقات المتبادلة ذات بعدين (Corrélations 2D) و مطيافية الكتلة (SM) ,والدوران الضوئي.

زيادة على ذلك قمنا باستخلاص ستة مركبات من الخمر" المرلو" الجزائري من بينها هوبيافينول الذي يعزل لأول مرة من النبيذ كما تم تحديد تركيز المركبات المستخلصة في عشرة أصناف من الخمر من شمال إفريقيا : الجزائر, المغرب و تونس, بواسطة تحليل مائع ذي ضغط عال .(HPLC) . لاحظنا بأن نسب المركبات المدروسة تختلف من نوعية إلى أخرى وأن مستوى التركيز لبعض المركبات مثل الباليدول, البيسيد والاستيلبين تعدى ما ذكر في المراجع العلمية المختصة.

بعض من هذه المركبات خضعت لفحوصات بيولوجية لمعرفة مدى فعاليتها على بعض الأمراض مثل الالتهابات و قابلية الحياة لخلايا سرطان الأمعاء الغليظة ,(MTT) فيما يخص المفعول ضد الالتهاب فإن مركب" الإيزوهوبيافينول" الذي هو رباعي الأرساغ لمركب " الرزفيراترول" ,أعطى أكبر فعالية ضد إنتاج جذر مونوكسيد النتروجين (NO) في البلغم الكبير من أحشاء الفأر. هذه النتيجة المهمة تشجع على الذهاب إلى ما هو أبعد كاستعمال هذه المركبات ضد خلايا سرطانية متعددة كما هي حاليا خاضعة لدراسات ضد الأبوبتوز ومرض الزهايمر (الخرف).

الكلمات الدالة

نبتة الدالية ,الرزفيراترول, الستيلبانات , الفلافونات ,رباعي الأرساغ, ثنائي الأرساغ ,خمر شمال إفريقيا , مفعول ضد الالتهاب, HPLC ,RMN ,CPC MTT ,NO, مطيافية الكتلة.

SUMMARY

In this study, twenty compounds of the polyphenols group were isolated from the stems of the vine *Vitis Vinifera* L., three of them are reported here, for the first time to be natural constituents of this plant ((-) *Trans* ε-viniferin, *trans* scirpusin A and nepalensinol B) , using a two-step method: centrifugal partition chromatography (CPC) followed by reversed-phase semi preparative HPLC. Chemical structures of compounds were elucidated using spectroscopic methods 1H NMR, 2D correlations, mass spectrometry and optical rotation. Compounds are of the stilbenes and dihydroflavanols families.

Furthermore, six polyphenolic compounds were isolated from Merlot wine from Algeria among which, (+)- hopeaphenol, a stilbene tetramer is reported here for the first time to be a constituent of wine . Furthermore, the six molecules were quantified in 10 commercial wines from North Africa by means of an analytical HPLC/DAD. Differences in concentrations were found for all tested compounds and levels of pallidol, piceid and Astilbin were higher than those reported in the literature.

Some of the isolated compounds are tested for their biological activities, such as anti-inflammatory activity and cellular viability of CACO2 cells, as for anti-inflammatory activity, isohopéaphénol, a resveratrol tetramer showed the strongest effect on inhibition of NO production in peritoneal macrophages in rats. These interesting results encourage us to go further such as testing these molecules as anticancer agents, as they are now under biological tests such as apoptosis induction, and against the β-amyloidal effect (Alzheimer disease).

Key words

Vitis vinifera, stilbenes, flavonoids, resveratrol, dimers, tetramers, Wine North Africa, anti-inflammatory, NO production, MTT, HPLC, CPC, NMR, mass spectrometry.

RÉSUMÉ

Dans cette étude, une vingtaine de composés polyphénoliques ont été isolés à partir des sarments de la vigne (*Vitis vinifera* L.*)*, trois d'entre eux ; (-) *Trans* ε-viniferin, la *trans* scirpusin A et le nepalensinol B sont reportés pour la première fois comme constituants naturels de cette plante. La méthode de fractionnement utilisée est à deux étapes : Une chromatographie de partage centrifuge (CPC) suivie d'une HPLC semi-préparative en phase inverse. La structure chimique des composés isolés a été élucidée en utilisant les méthodes spectroscopiques classiques : RMN du proton, corrélations 2D, spectrométrie de masse et rotation optique.

Par ailleurs, le vin de la variété Merlot d'Algérie a été soumis au fractionnement, six composés polyphénoliques ont été isolés parmi lesquels, le (+) - hopéaphénol est reporté pour la première fois dans le vin. En outre, ces molécules ont été quantifiées dans dix variétés de vins commerciaux de l'Afrique du Nord au moyen d'une méthode HPLC/DAD. Les concentrations en polyphénols étaient très variables. Les teneurs trouvées pour le pallidol, le picéide et l'astilbin n'ont jamais été enregistrées dans le vin.

Certains composés parmi ceux isolés à partir de la vigne (*vitis vinifera* L.) ont été testés pour leurs activités biologiques, telles que l'activité anti-inflammatoire et la viabilité cellulaire des Caco2 (cellules cancéreuses de côlon) pour ce qui de l'activité anti-inflammatoire, l'isohopéaphénol a montré l'effet le plus puissant sur l'inhibition de la production de NO dans des macrophages péritonéaux de rats. Ce résultat intéressant nous encourage à aller plus loin et essayer de tester ces molécules contre d'autres lignées cancéreuses , certains parmi ces composés sont en cours d'utilisation pour d'autres types de tests, telle que l'induction de l'apoptose et l'activité anti-amyloidogénèse (maladie d'Alzheimer).

Mots clés

Vitis vinifera, stilbènes, flavonoïdes, resvératrol, dimères, tétramères, vins d'Afrique du Nord, Tests anti-inflammatoires, NO, MTT, HPLC, CPC, RMN, spectrométrie de masse.

À la mémoire de mes regrettés ***chers parents*** ,

À mon ***mari***,

À mes enfants ***Aymen*** et ***Yomna***

À toute ***ma famille*** et ***ma belle famille***.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Mycologie et biotechnologie végétale de l'Université Victor Segalen Bordeaux II sous la direction du

Professeur Jean-Michel Mérillon *,*

J'aimerais tout d'abord vous remercier de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et offert l'opportunité de réaliser cette thèse et d'élargir mes connaissances en matière de phytopharmacie, de purification et d'identification des composés polyphénoliques. Merci d'avoir guidé ce travail, et pour la confiance que vous m'avez témoignée. Vos connaissances et vos conseils m'ont permis de mener à bien ce sujet de recherche. Merci pour votre encouragement, votre sympathie et votre humour réconfortant (il faut y croire !!) et de m'avoir aussi laissé la possibilité de créer des collaborations étroites qui ont permis la réalisation de ce travail. Merci pour avoir accepté de venir en Algérie pour assister à ma soutenance.

Dr Jean–Claude Delaunay *,*

J'aimerais de la même façon vous remercier d'avoir accepté de me superviser, pour votre savoir-faire, vos connaissances dans le domaine de la phytochimie, et surtout de m'avoir appris les techniques de CPC et d'HPLC, pour votre compréhension et votre bonne humeur.

Dr Tristan Richard,

Le spécialiste de l' RMN du groupe Gesvab, merci pour ta patience, pour tous les échantillons que tu m'a passés et identifiés, un grand merci pour avoir bien veillé sur les échantillons que j'ai laissés et sur lesquels tu continues à travailler, merci pour les bonnes nouvelles que tu m'annonçais à chaque fois qu'une molécule intéressante est identifiée, merci aussi pour ton soutien et ta gentillesse.

Pr. Mabrouk Teguiche*, mon encadreur en Algérie,*

Merci pour m'avoir initié à la phytochimie et aux techniques de purification (cristallisation) et pour vos connaissances en matière de chimie organique, pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Un grand merci aux ***membres du jury*** *pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'aide précieuse de certains collègues que je tiens vivement à remercier :

***Dr Josep Valls** , « le Catalan »,*

Merci pour tes conseils avisés et pour ton aide précieuse notamment en HPLC, je tiens à te féliciter pour ta rigueur scientifique, pour ton sérieux, ta gentillesse, ta patience, ta joie de vivre et ta disponibilité sans limite.

***Dr Pierre Waffo-Teguo**,*

Merci pour les nombreuses heures que tu a passé à analyser mes spectres RMN.

Assia

Ma chère amie, merci pour tous les services que tu m'as rendus. Je ne saurais trouver les mots pour te remercier comme tu le mérites mais je n'oublierai pas et je prie dieu pour me donner l'occasion pour rendre un peu du bien que tu m'as fait. A chaque fois que j'étais malade, déprimée ou avais envie de parler, il y avait toi, tu étais toujours là à l'écoute et tu as continué même après mon retour chez moi. Milles merc.i

Caroline,

Merci pour les tests MTT et pour m'avoir aidé à tracer les courbes et corriger la partie des tests biologiques. Merci pour ta gentillesse, ton sourire et ta sympathie.

Fabienne,

Merci de m'avoir aidé à maîtriser les gradients HPLC, pour ta gentillesse, ton humour et ta compréhension.

Xavier

Merci pour ton soutien, pour tes services et ton investissement à chaque fois que j'avais besoin de toi.

*Merci à **Stéphanie K**. et à **Cassandrine** pour leur amitié.*

*Merci aux chercheurs du labo : **Stéphanie C**., **Alain Decendit** et **Nadège Telef** pour leur gentillesse et leur sympathie, pour leur aide et leurs conseils et pour les discussions passionnantes sur les polyphénols.*

***Professeur Jean-Michel Léger** (laboratoire de chimie physique (cristallographie)),*

Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus vifs pour avoir eu la gentillesse d'analyser par RX plusieurs échantillons que j'essayais de cristalliser, et à vous exprimer mon

admiration pour votre simplicité et votre compréhension, sans oublier votre collaborateur Stéphan Massip.

<u>Pr Djaad Mossalayi</u>

Chef de l'équipe « Bases thérapeutiques des inflammations et infections », merci pour le test anti-inflammatoire (NO).

<u>Dr Alain Badoc</u>

J'aimerais te remercier pour ta gentillesse et ta serviabilité, pour m'avoir aidé dans la recherche bibliographique sur mon sujet de thèse et tout ce qui était en rapport avec le côté botanique.

<u>Kléopatra (DEA)</u>

Merci à toi, ma douce collaboratrice (dans la partie dosage des vins de l'Afrique du Nord) pour ta sympathie et pour ton aide dans la rédaction de l'article. Je te souhaite bonne chance pour la suite et plein de publications pour ta thèse!

*Un grand merci à la douce et aimable **Marie-Laure** et à **Gégé**, pour leur aide précieuse dans les manips.*

*Je tiens aussi à remercier les étudiants, **Hélène**, **Lucie** et **Stéphan**, **Antonio** pour les photocopies et **Arthur** pour la verrerie.*

***A Mon mari** : parfois, les mots deviennent insignifiants devant les faits ; le grand sacrifice que tu as fait en acceptant de me laisser partir pour faire ma thèse en France et de garder nos enfants et bien veiller sur eux pendant mon absence, restera le meilleur cadeau que tu m'as offert jusque là. Merci pour ta patience et ton soutien pendant mon séjour en France et même avant, et lors de la rédaction du manuscrit…*

Et finalement mes remerciements vont à toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées mais à qui je témoigne toute mon affection.

1. INTRODUCTION

1.1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que: malaria, première cause de mortalité dans le monde, Cancer, Alzheimer, Leishmaniose, infections virales et bactériennes. A ceci, s'ajoute l'augmentation de l'incidence des infections fongiques avec l'émergence de nouvelles maladies qui affaiblissent le système immunitaire (SIDA), le recours aux traitements immunosuppresseurs (afin d'éviter les rejets de greffes), les traitements antinéoplasiques de plus en plus agressifs, ainsi que l'apparition de souches de microorganismes de plus en plus résistantes aux traitements connus. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux.

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne principalement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances ou de nouveaux ''lead compounds'', si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires (Hostettmann , 2002). En effet, sur environ les 300'000 à 500'000 espèces végétales (Principe, 1989), seule une petite partie a fait l'objet d'investigations phytochimiques.

Depuis quelques années, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de légumes, de fruits et de certaines boissons peut prévenir des maladies cardiovasculaires et certains cancers (Block, 1992 ; Willett, 1993). Les effets bénéfiques des légumes et des fruits ou de leurs extraits sur la santé humaine, observés lors d'études *in vitro*, sont généralement attribués aux produits naturels tels que les vitamines (Vitamine C, anti-oxydant), les caroténoïdes, les phyto-estrogènes et les polyphénols. Des travaux d'auteurs ont montré que les polyphénols présentaient des propriétés anti-cancéreuses notables et qu'ils peuvent agir à tous les stades de la cancérogénèse, notamment en protégeant l'ADN de l'attaque radicalaire, en inactivant les carcinogènes, en inhibant les enzymes impliquées dans l'activation des procarcinogènes et en activant celles responsables de la détoxication des substances xénobiotiques (molécules étrangères à l'organisme de faible poids moléculaire) (Bravo, 1998 ;

Lairon, 1999 ; Roy, 2003 ; Billard, 2002 ; Rafter, 2002 ; Potter, 1997). Bien que de nombreux produits purs, naturels ou de synthèse, ont montré une activité inhibitrice sur le développement du cancer lors d'études *in vitro* ou sur des animaux, la combinaison d'une variété de produits naturels issus de fruits et de légumes (oignon, thé, vin rouge, etc.) possède une activité anticancéreuse plus marquée (Potter, 1997 ; Boileau, 2003 ; Frei, 2003).

1.2. POLYPHENOLS

Actuellement, plus de 8000 polyphenols ont été identifiés (Dreosti, 2000). Ce sont des métabolites secondaires des plantes, représentant les composés phytochimiques essentiels des légumes des fruits et d'autres plantes. Les polyphénols sont associés non seulement aux effets bénéfiques de la santé humaine mais aussi aux propriétés colorantes et sensorielles des boissons tel que le vin (Harborne, 2000 ;Durbin, 2003 ; Brouillard, 2003 ; Duthie, 2003)

Les plus communs parmi les polyphénols sont les acides hydroxy-cinnamiques les flavonoïdes et les anthocyanes. La plupart des flavonoïdes existant dans les plantes sont conjugués avec des sucres, pectines, des acides organiques ou sont sous forme de polymères (Wang, 2003 ;German ,2000). Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal. La vigne *Vitis vinifera* est l'une des plantes particulièrement riche en polyphénols (Dreosti, 2000 ;Harborne, 2000 ; Durbin ,2003 ; Brouillard, 2003 ; Duthie 2003; Wang, 2003 ;German, 2000) qui sont essentiellement des stilbènes.

1.3. LA VIGNE

1.3.1. Classification

La vigne est un arbrisseau sarmenteux de la famille des Vitacées (*Vitaceae)*, précédemment appelée *Ampélidacées* largement cultivée pour ses fruits en grappes, le raisin, dont on tire le vin. Il en existe d'innombrables variétés cultivées appelées cépages : Cabernet, Chardonnay, Merlot, Pinot, Sauvignon, etc. La culture de la vigne, ou viticulture, occupe environ 8 millions d'hectares dans le monde.

Nom scientifique : *Vitis vinifera* L. (Tableau 1.1)

C'est une espèce cultivée depuis des temps immémoriaux en Europe, dans l'ouest de l'Asie (Moyen-Orient, Caucase) et le nord de l'Afrique, mais que l'on peut trouver à l'état subspontané, notamment dans le sud de la France. Elle a été introduite dans tous les continents, et la viticulture a pris de l'importance en Amérique du Nord (Californie), du Sud (Argentine, Chili), en Australie, en Afrique du Sud et en Chine.

Un terrain planté de vigne s'appelle un vignoble.

Tableau 1.1 : Classification classique de la vigne

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rhamnales
Famille	Vitaceae
Genre	Vitis
Nom binomial	
Vitis vinifera L.	
Classification phylogénétique	
Ordre	Vitales
Famille	Vitaceae

1.3.2. Les différentes espèces de vigne

Le genre *Vitis* comprend de très nombreuses espèces :

On trouve notamment en Amérique du Nord :

- *Vitis labrusca*, la vigne américaine ou vigne isabelle (en anglais *fox grape*, dont les raisins ont un goût « foxé » peu apprécié en Europe ;
- *Vitis riparia*, la vigne des rivages (*frost grape*) ;
- *Vitis rupestris*, la vigne des rochers (*sand grape*) ;
- *Vitis berlandieri* Planch.(ou *Vitis cinerea* var. *helleri*), la vigne espagnole (*Spanish grape*).

Peu sensibles au phylloxéra, ces vignes, ainsi que leurs hybrides, sont utilisées soit comme porte-greffes, soit par croisement avec des variétés de *Vitis vinifera* sous forme d'hybrides producteurs (non admis dans les appellations).

En Extrême Orient, on trouve :

- *Vitis amurensis* Rupr., (fleuve) ;
- *Vitis coignetiae* Pulliat ex Planch, vigne du japon ;

qui ne présentent pas d'intérêt pour la viticulture mais qui sont des sources de stilbènes et de leurs oligomères. On appelle aussi vignes d'autres plantes de la famille des *Vitacées* :

- les vignes-vierges vraies appartenant au genre *Parthenocissus*,

- les vignes-vierges apparentées appartenant aux genres *Ampelocissus, Ampelopsis et Cissus*, très proches du précédent et du genre *Vitis*

Étymologiquement, ces noms dérivent du grec *ampelos*, la vigne, et *cissos*, le lierre. D'autres plantes, qui se rapprochent vaguement de la vigne par le port, la forme des feuilles ou des fruits, portent également en français le nom de vigne. Ainsi on appelle :

- vigne blanche, la bryone, *Bryonia dioica* Jacq., Cucurbitacées ;
- vigne de Judée, la douce-amère, *Solanum dulcamara* L., Solanacées ;
- vigne du Nord, le houblon, *Humulus lupulus* L. Cannabinacées ;
- vigne noire, le tamier, *Tamus communis* L., Dioscoréacées ;
- vigne-blanche ou fausse Vigne, la clématite, *Clematis vitalba* L. Renonculacées ;
- vigne du mont Ida, l'airelle, *Vaccinium vitis-idaea* L., Éricacées.

1.3.3. Description

La vigne est un arbrisseau grimpant qui s'attache aux supports par des vrilles (attaches). Les tiges, taillées en culture, peuvent atteindre dans la nature de très grandes longueurs en grimpant dans les arbres. Les feuilles à nervure palmée comportent cinq lobes principaux plus ou moins découpés, et sont en forme de cœur à la base. Les fleurs sont très petites, verdâtres et regroupées en grappes composées. Les fruits murs sont des baies de forme et de couleur variables. Ils sont blancs, jaunâtres, violets ou noirs, et presque toujours noirs à l'état sauvage. Une description fine des variations de forme des feuilles et des fruits est nécessaire pour identifier les cépages. C'est l'objet de l'ampélographie.

Le **raisin** est le fruit amélioré de la vigne cultivée (*Vitis vinifera*). Il se présente sous la forme de grappes composées de nombreux grains, qui sont sur le plan botanique des baies, de petite taille et de couleur claire, le raisin blanc (verdâtre, jaunâtre, jaune doré) ou plus foncée, le raisin rouge (rose ou noir-violet).

Il sert surtout à la fabrication du vin à partir de son jus fermenté (on parle dans ce cas de raisin de cuve), mais se consomme également comme fruit, soit frais, le raisin de table, soit sec, le raisin sec qui est utilisé surtout en pâtisserie ou en cuisine. On consomme également du jus de raisin frais. Des baies on extrait aussi l'huile de pépins de raisin.

Les deux plus importantes variétés de cépage sont :

- ***Vitis vinifera***, originaire d'Europe, à partir de laquelle découlent tous les grands cépages pour le vin et le raisin de table.

- ***Vitis Labrusca***, originaire de l'Amérique du Nord, est utilisé essentiellement comme raisin de table et un petit peu pour le vin. Lors de l'attaque des vignes européennes par le Phylloxéra, les cépages européens ont pu être sauvés en les greffant sur des souches de ***Vitis Labrusca***.



Figure 1.1: Grappes de raisin sur la vigne (Koehler's images)

1.3.4. Composition et valeur nutritive

Sa forte teneur en sucre peut entraîner une cristallisation du sucre avec le temps. Pour décristalliser un raisin, il suffit de le plonger dans un liquide (de l'alcool, du jus de fruit ou de l'eau bouillante), le temps que le sucre se dissolve. Riche en vitamines A, B et C, le raisin contient à peu près tous les oligo-éléments dans un équilibre parfaitement assimilable par l'organisme (tableau 1.2). Énergétique, reminéralisant, détoxiquant, rafraîchissant, laxatif, le raisin a aussi un effet sur la mémoire, le renouvellement des cellules ou encore la protection des vaisseaux sanguins. La consommation de raisin est particulièrement indiquée dans les cas d'infections à répétition, de problèmes hépatiques, nerveux ou digestifs, d'hypertensions, de constipation ou d'insomnies. La peau du raisin peut être indigeste, surtout s'il n'est pas bien lavé.

Tableau 1.2 : valeur nutritive du raisin cru

Raisin cru (valeur nutritive (g) pour 100g)			
eau : 80,54	**cendres totales : 0,48**	**fibres : 0,9**	**valeur énerg. : 69 kcal**
protéines: 0,72	**lipides: 0,16**	**glucides: 18,10**	**sucres simples : 15,48**
oligo-éléments (mg)			
calcium : 10	**fer : 0,36**	**magnésium : 7**	**phosphore : 20**
potassium : 191	**cuivre : 0,127**	**sodium : 2**	**zinc : 0,07**
vitamines (mg)			
vitamine C : 10,8	**vitamine B1 : 0,069**	**vitamine B2 : 0,070**	**vitamine B3 : 0,188**
vitamine B5 : 0,050	**vitamine B6 : 0,086**	**vitamine B9 : 0 µg**	**vitamine B12 : 0,00 µg**
vitamine A : 66 UI	**rétinol : 0 µg**	**vitamine E : 0,19 µg**	**vitamine K : 14,6 µg**
acides gras (g)			
saturés : 0,054	**mono-insaturés : 0,007**	**poly-insaturés : 0,048**	**cholestérol : 0 mg**

1.3.5. Diverses variétés de raisin

Il existe des centaines de variétés de raisins ou cépages, parmi lesquels on distingue les cépages de cuve, blancs ou rouges, et les cépages de table (tableau 1.3).

Tableau 1.3: variétés du genre Vitis

Vitis acerifolia	***Vitis bourquina***	***Vitis doaniana***	***Vitis monticola***	***Vitis rotundifolia***	
vitis aestivalis	***Vitis californica***	***Vitis girdiana***	***Vitis mustangensis***	***Vitis riparia***	***Vitis tiliifolia***
Vitis amurensis	***Vitis x champinii***	***Vitis labrusca***	***Vitis x novae-angliae***	***Vitis rupestris***	***Vitis vinifera***
Vitis arizonica	***vitis cinerea***	***Vitis x labruscana***	***Vitis palmata***	***Vitis shuttleworthii***	***Vitis vulpina***

1.3.6. Les principaux cépages

Tableau 1.4: cépages fréquents

Nielluccio Ondenc Petit Manseng Petit Verdot Pineau d'Aunis Pinot blanc Pinot gris Pinot noir Piquepoul Poulsard Riesling Roussanne Sauvignon Savagnin	***Grenache Grolleau Gros Manseng Gros vert Italia Jacquère Jurançon blanc Jurançon noir Lledoner pelut Macabeu Manseng Marsanne Marselan Mauzac***	***Alicante Bouschet Aligoté Altesse Alphonse Lavallée Arbois Auxerrois Bourboulenc Brun argenté Cabernet franc Cabernet sauvignon Côt Counoise Cardinal Carignan***
Sciaccarello Sémillon Sylvaner Syrah Tannat Tempranillo Terret Tibouren Tourbat Trousseau Ugni blanc Vermentino Viognier	**Melon Merlot Meunier Mondeuse Mourvèdre Müller Thurgau Muscadelle Muscat à pts grains Muscat/Alexandri eMuscat/Hambour g Muscat OttonelNégrette**	**Chardonnay Chasselas Chenin Cinsault Clairette Colombard Danlas Dattier de Beyrouth Fer Folle blanche Gamay Gewurztraminer**

1.3.7. Utilisations de la vigne

1.3.7.1. vinification

- Dérivés de la vinification :
- moûts de raisin concentré,
- alcool de distillation du marc,
- pulpe de marc pour l'alimentation animale,
- tartres (pour acide tartrique destiné au secteur agro- alimentaire)

1.3.7.2. Production de boissons

- pétillant de raisin
- jus de raisin
- vinaigre

1.3.7.3. Autres dérivés alimentaires

- huile de pépins de raisin
- le pépin torréfié fournit un succédané (substitut) de café
- gelées et confitures
- conserves au sirop et à l'alcool
- Production de raisin frais (raisin de table)
- Production de raisins secs

1.3.7.4. Pharmacopée

- Partie utilisée : sève, feuille
- Propriété : Astringent, anti inflammatoire
- Mode d'emploi : Décoction

Les **larmes de vignes**, sécrétion obtenue lorsqu'une branche est cassée, est un excellent diurétique et collyre. Les décoctions de vrilles sont constrictives dans les diarrhées.

La vigne rouge (*Vitis vinifera var. tinctoria*) possède quand à elle des propriétés particulières dans les taches rouges de ses feuilles. Les anthocyanes sont des facteurs vitaminiques P puissants, c'est à dire qu'ils protègent et tonifient les capillaires et les veines et qui plus sont

astringents (≠ ramollissants) ce qui renforce cet effet. On l'utilise dans les cas de couperose, jambes lourdes, hémorroïdes, varices, ménopause et bouffées de chaleurs.

1.3.7.5. Autres utilisations

Le bois des ceps de vigne, d'un grain très fin, se conserve longtemps, et sert à fabriquer divers objets, notamment des cannes. Les sarments de vignes sont recherchés pour faire des grillades.

1.3.8. Histoire de la vigne et du vin

L'histoire de la vigne et du vin est si ancienne qu'elle se confond avec l'histoire de l'homme.

Dans le tableau (1.5) ci-dessous, nous présentons un bref historique de la vigne.

Tableau 1.5: Historique de l'implantation de la vigne (Roger, 1959)

apparition de la vigne dans le Caucase et en Mésopotamie	**6000 av. J. C.**
la vigne est cultivée en Égypte et en Phénicie	**3000 av. J. C.**
apparition en Grèce	**2000 av. J. C.**
la vigne est cultivée en Italie, en Sicile et en Afrique du Nord	**1000 av. J. C.**
apparition en Espagne, au Portugal et dans le sud de la France	**1000- 500 av. J. C.**
implantation au nord de l'Europe, sous l'influence des Romains, et jusqu'en Grande Bretagne.	**500 av. J. C.- Moyen Âge**

1.3.9. Importance économique

La surface totale du vignoble mondial représentait 7,886 millions d'hectares en 2000, dont :

- Europe : 62,7 % (France 11,6, Italie 11,5, Espagne 14,9).
- Asie : 19,2 % (Chine 3,3)
- Amérique : 11,9 % (États Unis 5,2, Argentine 2,7, Chili 2,2).
- Afrique : 4,3 (Afrique du Sud 1,5).
- Océanie : 11,9 % (Australie 1,8).

La part de l'Europe diminue (perte de 4 points depuis 1996) tandis que celle des autres continents augmente.

1.3.10. Les ennemis de la vigne

a)Agressions climatiques

b) ***Échaudage*** *(grillage des jeunes raisins)*

c)Folletage (dessèchement partiel des ceps),:

Foudre, gelées (de printemps), protection par butage (recouvrement surtout par de la terre) et des ventilateurs géant pour amener l'air plus chaud de 30 m d'altitude vers le sol, grêle

d) Maladies non parasitaires

- Carences diverses (ou insuffisances plus ou moins graves) :

- en azote et elle se manifeste par des feuilles petites et pâles, voire jaunâtres. Plante peu poussant, peu productive.
- Bore : Les feuilles ont un aspect crispé, épais. Les sarments présentent des déformations et des écorces anormales.
- Magnésium. Les feuilles de la base surtout, présentent des décolorations internervaires. Se manifeste tardivement en saison, à partir de la véraison.
- Manganèse, Zinc, Potasse.
- Chlorose *ferrique* (carence en fer) La chlorose ferrique est une décoloration plus ou moins prononcée des feuilles, due à une insuffisance de production de chlorophylle par la plante. La couleur va du vert pâle au blanc jaunâtre, en fonction de la gravité. Il arrive quelquefois que cette décoloration s'estompe, avec l'apparition de la chaleur, en saison.

-Coulure (avortement des fleurs)

-Millerandage (avortement partiel des raisins)

-Rougeot et flavescence (rougissement ou jaunissement du feuillage)

e) Maladies à virus

-Dégénérescence infectieuse, court noué, mosaïque, maladie de Pierce

f) Maladies cryptogamiques

Anthracnose ou charbon de la vigne, Apoplexie ou maladie de l'amadou, **black rot**, brenner ou **rote brenner**, **excoriose**, **fumagine**, **oïdium**, **mildiou**, **pourridié** ou blanc des racines, **pourriture grise** ou pourriture noble, **rot blanc** .

g) Parasites animaux

Acariens : *araignée rouge, Érinose*

Insectes **:** Altise de la vigne, cochylis ou teigne de la grappe, cécidomye de la vigne, cochenilles de la vigne, eudémis ou tordeuse de la grappe, eumolpe, gribouri ou écrivain, hanneton commun, hanneton vert, pyrale de la vigne, grisette de la vigne ou calocoris, noctuelles, phylloxéra, pucerons, rhynchite ou cigarier de la vigne, sphinx de la vigne, nématodes.

1.4. LES COMPOSÉS PHENOLIQUES DE LAVIGNE

Le raisin, fruit de la vigne, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, des terpènes (citrol, geraniol…), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline…), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins.

1.4.1. Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

1.4.1.1. Les acides phénoliques

On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine. D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (Figure 1.2). Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *t*-caféique l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique (Singleton, 1978; Goetz, 1999).

Esters hydroxycinnamiques	R1	R2
Acide t-caféique	**OH**	**H**
Acide p-coumarique	**H**	**H**
Acide t-fertarique	**OCH3**	**H**
Acide t-sinapique	**OCH3**	**OCH3**

Figure 1.2: Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins.

1.4.1.2. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué (figure 1.3). Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l'ε-viniférine (cf. chapitre 3) (Waterhouse, 1994; Langcake, 1981).

Stilbènes	R1	R2
Ptérostilbène	**OCH_3**	**OCH_3**
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGlc	OH

Figure 1.3: Structures chimiques de quelques stilbènes.

Ce type de molécules existe aussi sous la forme de dérivés trimériques jusqu'à pentamériques (Bokel 1988 ; Kawabata,1989; Ohyama, 1994, Ohyama, 1994; Ohyama,1996; Sarker,1999; Sultanbawa,1981; Tanaka,1998). Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Frankel, 1993). On leur attribue aussi des activités chimiopréventives contre le cancer (Jang, 1997)

1.4.2. Les composés flavonoïdes

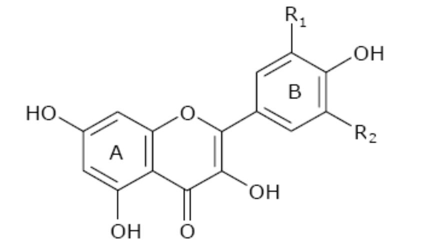
Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Figure 1.4). Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Bourzeix, 1986).

Figure 1.4: Squelette d'un flavonoïde

1.4.2.1. Les flavonols

Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin: Le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnéthine (Figure 1.5). Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges (Remy,1999). On leur attribue des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du

coeur et des cancers (Bohm,1998; Hertog,1993; Vinson,1995), ou encore des activités antitumorales et chimiopréventives (Lacaille-Dubois,1996) .



Flavonols	**R1**	**R2**
Kaempferol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH

Figure 1.5: Structures chimiques de quelques flavonols

1.4.2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3 (Ribereau-Gayon,1968) . Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. On distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis* (Figure 1.6).

Anthocyanidines R*=H	**R1**	**R2**
Malvidine	OCH_3	OCH_3
Péonidine	OCH_3	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH_3	OH

Figure 1.6: Structures chimiques de quelques anthocyanidines * : Forme monoglucoside, R=glucose

Contrairement à d'autres espèces qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglucosylées en position C-3' et C-5', l'espèce *Vitis vinifera* n'en contient que des traces et se caractérise par la présence majoritaire de 3-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier de la malvidine 3-*O*-glucoside et de ses dérivés acylés (Baldi, 1995). Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La forme flavylium, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carabinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue). Pour la malvidine-3-*O*-glucoside, la forme hémiacétal (AOH) est largement majoritaire. Toutefois, le cation flavylium est en quantité suffisante pour que sa couleur rouge prédomine.

1.4.2.3. *Les tanins condensés (flavan-3-ols)*

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, vin, thé…) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits et spécialement des vins (Haslam, 1998 ; Haslam, 1980, Escribo-Bailon, 1992). Dans la baie de raisin, la pellicule et les pépins sont les zones de concentration des tanins et des composés phénoliques (Ricardo-da-Silva, 1992 ; Escribo-Bailon , 1992 ; Souquet,1996) . Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylés (Hemingway, 1992).

**Les unités monomériques*

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure 1.7). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules de *Vitis vinifera*, implique leur existence en tant que monomère (Souquet,1996).

Flavanols	R1	R2	R3
(+)-catéchine	OH	H	H
(-)-épicatéchine	H	H	H
(+)-gallocatéchine	OH	H	OH
(-)-épigallocatéchine	H	OH	OH

Figure 1.7: Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés.

Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier la (-)-épicatéchine, formant la (-)-épicatéchine-3-*O*-gallate (Figure 1.8) (Su, 2001; Weinges,1971; Boukharta,1988)

Figure 1.8: Structure de l'(-)-épicatéchine-3-*O*-gallate

**Les tanins condensés (type A et B)*

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique (Bate-Smith,1986; Hemingway,1983). Dans le raisin on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyane libérée. D'une part, les procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), libèrent de la cyanidine ; d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), libèrent de la delphinidine (Czochanska,1979). Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre-elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées (Boukharta,1988 ; Escribo-Bailon,1995 ; Prieur ,1994)].

Le type B se caractérise par une liaison intermonomérique qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement (R), mais il existe quelques exceptions. Les structures des principaux dimères de type B du raisin sont représentés par la figure (1.9). Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A (Figure 1.10).

Les flavan-3-ols, présents dans le raisin, se rencontrent majoritairement sous la forme de polymères. Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylées (Prieur,1994), alors que ceux des pellicules contiennent également des prodelphinidines (Souquet,1996). La Figure (1.11) représente la structure d'une procyanidine polymérique. On y distingue l'unité supérieure, les unités intermédiaires et l'unité inférieure. Les unités monomériques se répartissent indifféremment dans le polymère, aussi bien dans les unités supérieures qu'en position terminale. Toutefois, on note la prédominance de l'épicatéchine (galloylée ou non) dans les unités supérieures (Souquet,1996).

Le nombre moyen d'unités monomériques, défini comme le degré moyen de polymérisation, peut aller jusqu'à 18 dans une fraction issue de pépins (Ricardo-da-Silva ,1991) et avoisine les 30 unités dans un extrait de pellicule (Souquet,1996). D'importants travaux ont mis en évidence certaines propriétés biologiques et pharmaceutiques des tanins: antivirales (Haslam, 1998), antitumorales et chimiopréventives (Lacaille-Dubois ,1996). Ce sont également des antioxydants capables de piéger les radicaux libres (Hemingway ,1983 ; Ricardo-da-Silva ,1991 ; Benzie, 1999 ;Plumb,1998 ;Teissedre, 1996) Notons le travail de *E. Haslam* (1998) (Haslam, 1998), qui a résumé de façon générale les propriétés physiologiques de ces composés.

Figure 1.9: Structures chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B

Figure 1.10: Proanthocyanidine A-2

Figure 1.11: Variations possibles de la structure polymérique d'un tanin condensé

1.5 LE RESVÉRATROL

Le resvératrol, trans-3, 5,4'-trihydroxystilbène, a été isolé pour la première fois en 1940 à partir des racines de Veratrum grandiflorum O., puis des racines de *Polygonum cuspidatum*, (appelé Ko-jo-kon en Japonais), qui est utilisée en médecine traditionnelle par les japonais et les Chinois pour traiter les dermatites suppuratives (Takaoka, 1940 ; Cichewicz, 2002). En 1976, Le resvératrol a été détecté dans l'épiderme des feuilles et la pellicule du raisin mais pas dans la

pulpe (Langcake, 1976 ; Creasy, 1988). La pellicule fraiche de raisin contient 50-100 mg de resvératrol par gramme, et la concentration dans le vin s'étale de 0.2 mg/l to 7.7 mg/l. Le resvératrol a par la suite été trouvé dans diverses plantes, baies, arachides mûres et rhubarbe (figure 1.13) d'autres sources du resvératrol et ses analogues sont présentés en annexe A.

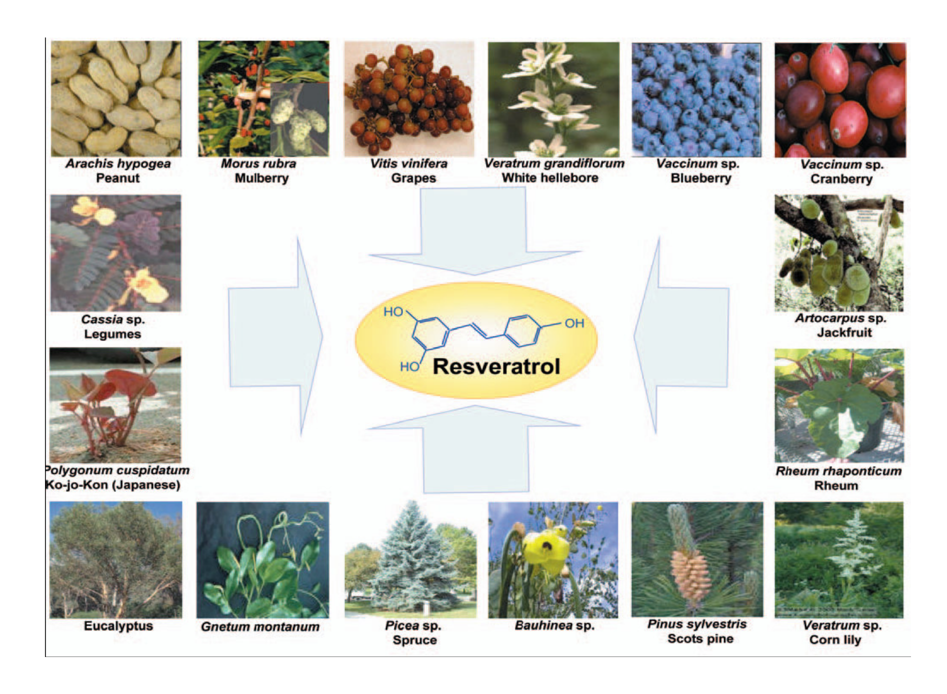


Figure 1.12: Quelques plantes contenant le resvératrol

1.5.1. Activités biologiques du resvératrol

1.5.1.1. Activités anti-oxydantes

De nombreuses pathologies, à savoir les maladies cardiovasculaires, les cancers, les processus inflammatoires ou encore les maladies neurologiques, sont associées au stress oxydant (Zhang, 1999). Les principales activités biologiques attribuées au resvératrol sont essentiellement dues à son activité anti-oxydante (Orallo,2006) Cette capacité anti-oxydante peut être évaluée *in vitro* aussi bien par piégeage des radicaux libres que par chélation des métaux largement connus pour être impliqués dans les réactions radicalaires. Le resvératrol permet de piéger l'anion superoxyde qui est une espèce souvent à l'origine des dégâts oxydatifs. Aussi, il permet, à des concentrations micromolaires, d'inhiber l'oxydation des vésicules lipidiques ou des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Holvoet, 2004)

A ce jour, les principales activités biologiques du resvératrol répertoriées sont :

1.5.1.2. Le domaine cardiovasculaire

le resvératrol inhibe l'agrégation plaquettaire en inhibant la production de médiateurs conduisant à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes lors de la formation d'un caillot dans les

évènements thrombotiques. De même, en inhibant l'oxydation lipidique, il réduit les dépôts de cholestérol dans les artères et diminue ainsi les accidents cardio-vasculaires (Holvoet, 2004).

1.5.1.3. L'activité anticancéreuse

C'est dans ce domaine que les travaux effectués ont été les plus nombreux. Ces études ont montré des effets antiprolifératifs du resvératrol sur des cellules tumorales en culture ainsi qu'une réduction de la taille et du nombre de tumeurs. L'action du resvératrol semble aller au-delà de son activité anti-oxydante. En effet, des études récentes ont révélé que l'effet du resvératrol pourrait s'expliquer par des actions au niveau de l'expression de différentes protéines médiatrices (facteurs de transcription, oxygénases, …) (Jang, 1997). Le resvératrol présente donc, des propriétés anticancéreuses, grâce à sa capacité de supprimer la prolifération d'une grande variété de cellules tumorales, y compris les cancers lymphoïdes et myéloïdes ; myélome multiple ; cancers du sein, prostate, estomac, côlon, pancréas, et thyroïde ; mélanome ; carcinome de cellules de tête et de cou ; carcinome ovarien et carcinome cervical.

1.5.1.4. L'activité anti-inflammatoire

in vivo, le resvératrol est un inhibiteur efficace de la cyclooxygénase 2 (COX2) (Alarcon de la Lastra, 2005). Les cyclooxygénases sont des enzymes essentiels à la production de médiateurs pro-inflammatoires. Aussi des inhibiteurs de ces enzymes sont donc des anti-inflammatoires potentiels. Tout phénomène inflammatoire se traduit par la production d'une multitude de composés, le monoxyde d'azote, des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF-α, l'interleukine-1(IL-1) ou encore des espèces oxygénées actives, aux effets dangereux pour l'organisme. Des études ont montré que le resvératrol permet de réduire, voire d'inhiber la production d'un certain nombre de ces molécules (Marier, 2005).

1.5.1.5. L'activité neuroprotectrice

des études *in vivo* menées chez le rat ont montré un effet neuroprotecteur du resvératrol. Des rats prétraités avec du resvératrol, après induction d'une attaque cérébrale, présentaient des dommages neuronaux deux fois plus faibles que chez des rats non traités (Lu, 2006). Des travaux réalisés par Marambaud et al (Marambaud, 2005) ont révélé que le resvératrol permettait d'induire la dégradation du peptide Aβ, constituant majeur des plaques séniles formées au cours de la maladie d'Alzheimer par un mécanisme impliquant le protéasome (système impliqué dans la dégradation des protéines dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson).

En plus des ces activités, le resvératrol possède aussi un effet anti-âge et sur l'endurance sportive (Wade, 2006) Ces multiples activités biologiques du resvératrol font de ce composé un

outil thérapeutique très prometteur pour le traitement des différentes maladies du système nerveux central à composantes dégénératives et inflammatoires (Baur, 2006).

1.6. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES OLIGOMÈRES DU RESVÉRATROL

Le *trans* resvératrol n'est pas le seul stilbène qui a montré des activités biologiques intéressantes, mais ses analogues tels que le picéatannol, le ptérostilbène et le picéide ont aussi prouvé des effets thérapeutiques prononcés. Les oligomères de resvératrol tels que les dimères l'ε-viniférine (Privat, 1976, Piver, 2003) et les tétramères (Hopéaphénol, Heyneanol, vaticanol) (Masayoshi, 1999) ont aussi montré diverses activités biologiques parmi lesquelles la cytotoxicité des cellules cancéreuses. Chung *et al*. (chung, 2003) ont examiné l'activité anti-inflammatoire de l'α-viniferin (trimère du resvératrol) et ont montré qu'elle possède des effets inhibiteurs de la COX -2 (IC50, 4.9 μM), et inhibe faiblement la COX-1 (55.2±2.1% du témoin [100%] à 100 μM).

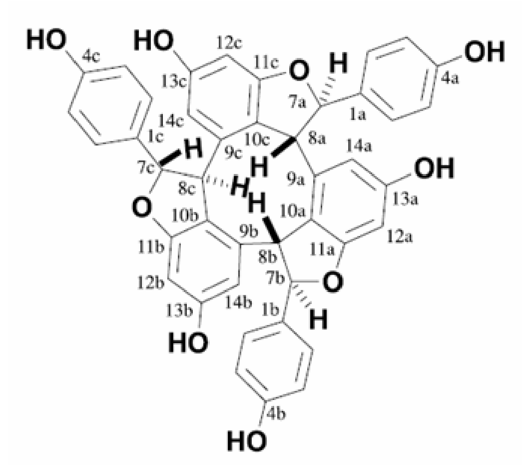


Figure 1.13: α-Viniferin (trimère)

Huang *et al.* ont examiné l'activité anti-inflammatoire des tétramères du resvératrol parmi lesquels, le (+)-hopéaphénol, l'isohopéaphénol, la vitisin A, le (+)-vitisifuran A, et le heyneanol A ont montré une inhibition potentielle de la biosynthèse du leukotriene B4, alors que les amurensins (tétramères du resvératrol de *Vitis Amurensis*) I et L ont fortement provoqué l'histamine acceptor .

Mishima *et al.* ont montré que le vaticanol C, un tétramère du resvératrol (*Vatica Indica*) possède une activité cytotoxique potentielle contre des lignées cellulaires diverses (Mishima, 2003). Ces auteurs ont examiné l'activité anti-tumorale de l'extrait éthanolique des écorces des sarments de *Vateria indica,* plante médicinale utilisée par les indiens. Des analyses par HPLC ont montré que cet extrait contenait entre autres, l'hopéaphénol, le vaticanol C, et l'ε-viniferin. Un essai *in vitro* de l'extrait a montré l'activité anticancéreuse contre les cellules tumorales

(sarcome 180) de la souris (IC50, 29.5 µM). L'extrait n'a montré aucune toxicité pour la souris même à des doses de 1000 mg/kg (poids corporel) administré quotidiennement pour 28 jours.

Figure 1.14: Vaticanol C ; Tétramère du resvératrol (*Vatica Indica)*

Le heyneanol A a été isolé pour la première fois des racines de *Vitis Heyneana* en 1996 (Li, 1996) et à partir des racines de *Vitis Amurensis* en 2001 (Huang, 2001), dans cette dernière référence, on a reporté l'activité anti-inflammatoire du heyneanol par inhibition potentielle de la biosynthèse de leukotriene B4.

Le heyneanol A a montré une induction de l'apoptose des cellules leucémiques humaines (IC50 = 6.6 µM, après 24 h) 15fois plus efficacement que le resvératrol (IC50 = 100 µM, après 24 h) (Lee, 2004). Lee et al. (Lee, 2006) ont montré l'inhibition de la croissance tumorale d'un cancer de poumon par le heyneanol A (Lee, 2006)

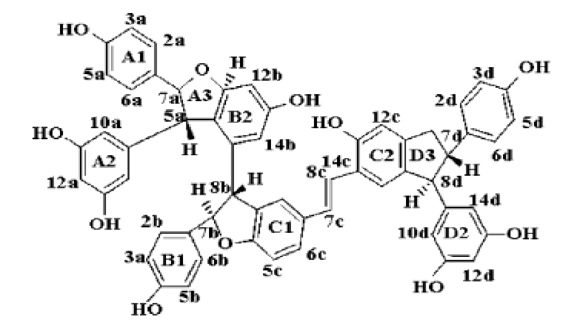


Figure 1.15: Heyneanol **A** Tétramère de resvératrol (*Vitis heyneana*)

1.7. LE VIN ET LES POLYPHÉNOLS

Le vin est un dérivé de la vigne qui consiste à laisser fermenter les grappes de raisin (vins rouges) ou le jus de raisin (vins blancs), une partie des sucres se transforme en alcool. Une des particularités des vins rouges, par rapport aux autres boissons alcoolisées, est de contenir de nombreux polyphénols : les anthocyanes, les catéchines et leurs oligomères (plusieurs grammes

par litre de vin) (Siemann, 1992) mais également, les stilbènes (quelques dizaines de mg par litre de vin) (Golberg, 1995).

Landrault et al ont testé l'activité antioxydante de produits purs (polyphénols, catéchine, épicatéchine etc.) et celle de plusieurs variétés de vins rouges et ont montré que ces derniers possédaient l'activité antioxydante la plus importante et qui s'échelonnait de 12,8 mmol/L (Grenache) à 25,2mmol/L (Pinot Noir) (Landrault**,** 2001**).**

Des études épidémiologiques ont prouvé que les maladies coronariennes sont moins répandues en France par rapport à d'autres pays de l'Europe et les états unis. C'était Serge Renaud lui-même qui a inventé l'expression « paradoxe français » quand il a découvert que les Français (notoirement, gros consommateurs de vins) en dépit de leur régime alimentaire à haute teneur en graisses, ont une incidence en maladies coronariennes inférieure de 30% par rapport aux Américains de même âge (Carando, 1999, Renaud, 1992, Renaud, 1999). Le paradoxe français a été attribué à la consommation régulière de vin. Il a été présumé que les substances phénoliques du vin rouge, par leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires pourraient être responsables de ces effets potentiels bénéfiques.

De nombreux stilbènes sont déjà déterminés dans le vin comme le *trans-resvératrol*, le picéide (Mattivi ,1993 ; Mattivi,1995 ;,Jeandet,1995 ; Roggero, 1994 ; Waterhouse, 1994 ; Lamuela-Raventos ,1994) et l'astringin (Ribeiro de Lima, 1999 ; Carando,1999], récemment, Baderschneider et winterhalter (2000) (Baderschneider,2000) ont isolé les compposés suivants à partir du vin Riesling: 2,4,6,trihydroxy-phenantrène-2-O-glycoside, *trans-resvératrol*-2-C-glycoside et un dimère du resvératrol ε-viniferin diglycoside, le pallidol-3-O-glycoside et le pallidol-3,3″-O-diglycosides. En utilisant la technique de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), Vitrac et al (2001) (Vitrac, 2001) ont isolé les dimères de resvératrol, pallidol et parthénocissine A à partir de vins français. En 2002, Landrault et al. (Landrault, 2002) ont quantifié la trans-ε-Viniferin dans des vins rouges et des vins blancs préparés avec des grappes infectées avec botrytis Cinerea. Finalement, en 2005, la δ-viniferin a été déterminée dans des vins Brésiliens (Vitrac, 2005). Les Dihydroflavonols semblent être rares dans les plantes et les aliments et, l'astilbin semble être le flavanonol le plus fréquent dans le vin.

Jusqu'à nos jours, aucune étude n'a reporté l'occurrence des trimères ni des tétramères de resveratrol dans le vin.

Depuis plus d'une décennie, de nombreux polyphénols ont été extraits à partir de diverses variétés de vins appartenant à différentes régions du monde. Les différences en teneur et en composition des polyphénols entre diverses variétés de vins semblent être dues à plusieurs facteurs parmi lesquels ceux qui se rapportent à la plante elle-même (la vigne) (figure 1.18): le terroir, les conditions climatiques, le sol et les facteurs se rapportant à la fabrication des vins : les méthodes de vinification, les conditions de stockage, l'erraflage etc. Le screening de la littérature a montré que très peu est connu sur les vins africains.

Le présent travail s'inscrit donc dans cette recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une utilisation en thérapeutique à partir de la vigne et du vin. Puisque nous considérons que les feuilles et les baies ont été bien investiguées phytochimiquement, nous nous sommes consacrées dans cette étude aux sarments et rafles de vigne en vue d'isoler des composés polyphénoliques, notamment des stilbènes. Ces composés après purification et identification structurale seront utilisés dans des tests biologiques, tels que les tests anti-inflammatoires et les tests de viabilité cellulaire.

D'autre part, nous avons abordé dans cette étude, le fractionnement d'une variété de vin algérien (Merlot) en vue d'isoler de nouveaux polyphénols. Par la suite ces molécules seront dosées dans dix variétés de vins appartenant aux trois pays du Maghreb : Algérie, Tunisie, et Maroc.

1.8. PLAN DE LA THÈSE

Cette thèse est divisée en Quatre chapitres :

Chapitre I : Introduction, nous présentons une introduction générale, sur les polyphénols de la vigne, leur structures chimiques, les activités biologiques les plus importantes, ainsi qu'une présentation de la vigne, les cépages les plus connus, l'utilisation des diverses parties de la vigne ainsi que les maladies et pathologies auxquelles est confrontée cette plante.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes, nous présentons l'appareillage utilisé pour l'extraction, la purification ainsi que l'identification structurale des composés. Les méthodes et techniques utilisées dans les trois parties de ce travail : 1) Purification de polyphénols à partir des sarments, 2) dosage de certaines molécules isolées dans des vins de l'Afrique du Nord 3) tests biologiques.

Chapitre 3 : Résultats et discussion : Nous présentons les principaux composés isolés à partir des sarments et des rafles avec leur structures chimiques, données RMN, masse et pouvoir rotatoire (dans certains cas). Nous présentons également les composés issus du fractionnement du vin de la variété Merlot d'Algérie, et les résultats des dosages effectués en utilisant des échantillons de vins de l'Afrique du Nord et finalement les résultats des tests biologiques effectués : immuno-enzymatique, anti-inflammatoire, et viabilité cellulaire

Chapitre 4 : Nous finissons par une conclusion générale et des perspectives.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. SOLVANTS

Tous les solvants que nous avons utilisés en chromatographie analytique ou préparative étaient de grade HPLC. L'Acétonitrile (ACN), l'acétate d'éthyle et l'hexane ont été fournis par Scharlau Chemie (Sentmenat, Espagne), le méthanol et l'éthanol par Carlo Erba (Val de Reuil, France), L'eau est distillée et filtrée à travers un filtre à membrane millipore (0.22 µm). Les solvants deutérés ; MeOH-d4, D2O, Acétone-d6 et MeOH-d4 ont été fournis par (Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA).

2.2. APPAREILLAGE

- Broyeur (tamis maille 1,5 mm, RetschMühle)
- Lyophilisateur (Unitrap modèle 10-100)
- Speed-vac (Savant)
- Évaporateur sous pression réduite (Laborota – 4000)
- Centrifugeuse (Bioblock scientific, model 3K18)
- FCPC : ″ Fast ″ Chromatography de Partage Centrifuge (Kromaton, France)
- HPLC Préparative/semi préparative : L'appareil utilisé était du type Varian

(Varian, modèle ProStar 210) avec une colonne Bischoff Prontosil C18 (250 x 8 mm, 5 µm diamètre de particule)

Détecteurs : Détecteur à barrettes de diode, ProStar 335 ou à lampe UV

HPLC analytique: Agilent avec détecteur série 1100 équipé de quatre pompes avec un dégazeur (modèle G1354A). Un autosampler (modèle G1313A), un compartiment de colonne (model G1316A) et un détecteur à barrettes de diode (modèle G1315B).

-Colonne: Bischoff Prontosil C18 (250 x 4 mm, 5 µm diamètre de la particule) thermostaté à 25°C.

- Débit : 1mL/mn

Spectre UV - rotation optique

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectrophotomètre du type Hitachi U-2000.

Les rotations optiques ont été mesurées dans le MeOH avec un polarimètre Perkin-Elmer 241 à 20°C.

Spectrométrie de masse

Les spectres MALDI-MS ont été obtenus par un spectromètre de masse du type TofSpec™ MALDI-Tof de Micromass™ (Manchester, UK). Les spectres ont été enregistrés dans le mode positif.

Spectroscopie RMN

Les spectres RMN ont été obtenus à 303 K dans le mode transformée de Fourier mode à 300 MHz sur un spectromètre du type Bruker AMX 300 équipe. Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm par rapport aux solvants deutérés (méthanol signal à δ 3.31 ppm ou acétone 2 ppm)

Lecteur de plaque (laboratoire GREF, INSERM E362, Université de Bordeaux 2)

Kit pour les tests anti-inflammatoires: »COX (bovine) Inhibitor Screening Assay », (Cayman Chemical).

2.3. BROYAGE ET MACÉRATION

Les sarments et les rafles du cépage Merlot sont récoltés à Villenave d'Ornon, région Bordelaise (Ouest de la France). Les sarments ont été découpés en petits morceaux et laissés sécher à l'air libre après quoi, ils ont été broyés finement. Environ 700 g de poudre ont été utilisés pour l'extraction dans une colonne de 8 cm de diamètre et de 1 mètre de longueur, à l'aide d'un mélange de solvants acétone/eau (80/20). La macération a duré environ 24 heures à température ambiante. Filtré, l'extrait obtenu est concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, en vue d'éliminer l'acétone.

2.4. EXTRACTION

L'extrait aqueux obtenu est soumis à une délipidation dans une ampoule à décanter à l'éther de pétrole en vue de le débarrasser de la chlorophylle, des lipides, des xanthophylles…etc. L'extrait aqueux issu de cette opération est soumis à l'extraction à l'aide de l'acétate d'éthyle.

La couche soluble dans l'acétate d'éthyle et la phase aqueuse sont lyophilisées séparément, on s'intéresse dans cette étude à la phase organique.

2.5. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE

2.5.1. Préparation du système de solvants

Le système de solvants utilisé est un mélange quaternaire, Hexane/ Éthanol/ Eau/Acétate d'éthyle selon la proportion des solvants, on définit deux systèmes :

Système 1 : 1/2/7/8 utilisé pour le fractionnement de la phase organique totale,

Système 2 : 3/3/5/4 pour le re-fractionnement des trois premiers tubes du système précédent et qu'on appelle fraction A,

Dans les deux cas précités, les quatre solvants sont introduits dans une ampoule à décanter, agités et séparés en deux phases ; la phase inférieure contenant essentiellement de l'eau et la phase supérieure contenant essentiellement de l'acétate d'éthyle, les deux autres solvants se répartissant entre les deux phases précédentes (Delaunay et al, 2002).

2.5.2. Injection

La phase organique lyophilisée (2,5g environ par injection) est dissoute dans 8ml d'un mélange de phase stationnaire et de phase mobile 50/50, filtrée à l'aide d'un filtre millipore circulaire de 4 cm de diamètre, elle est ensuite injectée (en mode « Load ») à l'aide d'une seringue spéciale dans la vanne d'injection, cette dernière sera ensuite basculée en mode « inject » et l'échantillon passera dans la colonne où il sera séparé en fonction de son affinité vers l'une ou l'autre des phases.

2.5.3. Conditions chromatographiques :

Au cours de la séparation, le débit est réglé à 3 ml/mn, et à raison de 3 mn par tube, la rotation est de 1000rpm.

2.5.4 Regroupement des tubes :

Le suivi de la séparation s'effectue à l'aide de plaques Chromatographique sur Couche Mince (CCM) sur des Polygram silica gel 0.2 mm avec indicateur de fluorescence UV_{254} (Macherey-Nagel). L'éluant est un mélange $CHCl_3$/MeOH/ HCOOH, 85/15/3 (v/v). La

visualisation des plaques CCM est réalisée par pulvérisation d'un réactif à base d'anisaldéhyde (9:1 (v/v) éthanol/ *p*-anisaldehyde acidifiée (acide sulfurique) (Paterson, 1994).

Pour le système 2, le regroupement se fait selon la répartition : 7-18, 19-20, 21-33, 34-50, 51-fin.

2.6 **HPLC ANALYTIQUE**

2.6.1Solvants utilisés

Les solvants utilisés sont A: H2O/(TFA (1%)), (97,5/2,5,V/V) et le solvant B est formé de 20 % solvant A et 80% Acétonitrile (V/V).

2.6.2 Gradient

Le gradient utilisé pour l'HPLC analytique (Figure 2.6) était: 20-50% B (0-35 min), 50-100% B (35-40 min), 100% B (41-46 min), 100-20% B (46-48 min), 20% B (48-53 min) (Tableau 2.1).

Tableau 2.1: Gradient HPLC analytique

Temps (mn :sec)	%A	%B	Débit (ml/min)
0	75	25	3
10	70	30	3
15	72	35	3
35	70	35	3
40	65	70	3
45	0	100	3
50	0	100	3
52	75	25	3
57	75	25	3
60	75	25	0

2.6.3 Injection

L'appareil HPLC Agilent est équipé d'un injecteur automatique, 300 µl d'une solution contenant l'échantillon à analyser dans 50% MeOH/H2O est préparée dans des cupules spéciales et injecté dans la colonne. La détection se fait à 280, 286, 306 et 330 nm (longueurs d'ondes caractéristiques des stilbènes).

2.7 HPLC SEMI-Preparative :

Le logiciel qui permet de piloter les diverses tâches d'une séparation est un Prostar dynamax, il permet entre autres d'établir un gradient (programme de séparation), de gérer l'injection, la variation de la composition et de la pression au cours de la séparation à l'aide d'un affichage au

cours de la séparation, le profil UV de chaque pic qui sort est aussi affiché au cours de la séparation. En plus de la possibilité que le logiciel offre pour le retraitement des chromatogrammes, intégration, …etc.

2.7.1. Préparation des échantillons

Les solutés à purifier sont dissouts dans 1ml 50% de phase B /H2O (40% des fois) déposés dans des eppendorfs et centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse, le surnageant est filtré sur un filtre millipore (Supelco, USA) en nylon et injecté dans la colonne HPLC.

2.7.2. Programmes utilisés pour la séparation

Les principaux programmes (gradients) HPLC qui ont été utilisés en fonction des purifications ; ils ont été nommés par rapport à leur utilisation.

Programme "mod-asc" :

Utilisation : purification des fractions du mode ascendant de la CPC

Tableau 2.2 : Gradient HPLC du mode ascendant

Temps (mn :sec)	%A	%B	Débit (ml/min)
0:00	80	20	3
10	75	25	3
30:00	72	28	3
35	65	35	3
40	65	35	3
45	60	40	3
50	30	70	3
55	0	100	3
60	0	100	3
62	80	20	3
67	80	20	3
68	80	20	0

Programme "repur vini " :

-*Utilisation* : repurification des molécules qui sortent après la *trans*- ε-viniferin : Elles sont collectées pendant la purification du mode ascendant et réinjectées plus tard en utilisant le programme ci-dessous de la fraction 33-60 du mode ascendant (Tableau 2.3) :

Tableau 2.3: Gradient *repur-vini*

Temps (mn :sec)	**%A**	**%B**	**Débit (ml/min)**
0:00	**91**	**9**	**3**
20	**75**	**25**	**3**
30:00	**72**	**28**	**3**
35	**72**	**28**	**3**
40	**70**	**30**	**3**
45	**65**	**35**	**3**
50	**65**	**35**	**3**
55	**60**	**40**	**3**
60	**0**	**100**	**3**
65	**0**	**100**	**3**
67	**91**	**9**	**3**
72	**91**	**9**	**3**
73	**91**	**9**	**0**

Programme "mod-desc"

Le gradient décrit par le tableau (2.4) a été conçu pour la purification des molécules du mode descendant en l'occurrence les tétramères du resvératrol:

Tableau 2.4: Gradient du mode descendant

Temps (mn :sec)	%A	%B	Débit (ml/min)
0:00	91	9	3
20	75	25	3
30:00	72	28	3
35	72	28	3
40	70	30	3
45	65	35	3
50	65	35	3
55	60	40	3
60	0	100	3
65	0	100	3
67	91	9	3
72	91	9	3
73	91	9	0

Programme" tetramer"

Le programme « tetramer » (Tableau 2.5) a été développé pour la repurification des tetramères: Hopéaphénol, isohopéaphénol, nepalensinol, etc.

Tableau 2.5: Gradient pour les tétramères

Temps (mn :sec)	%A	%B	Débit (ml/min)
0:00	91	9	3
20	75	25	3
30:00	72	28	3
35	72	28	3
40	70	30	3
45	65	35	3
50	65	35	3
55	60	40	3
60	0	100	3
65	0	100	3
67	91	9	3
72	91	9	3
73	91	9	0

2.8. ISOLEMENT DES POLYPHENOLS À PARTIR DU MERLOT (VIN ROUGE D'ALGÉRIE)

2.8.1. Évaporation et extraction

Trois litres et demi de Merlot (2004) ont été extraits en utilisant le protocole décrit par Vitrac et al (Vitrac, 2000). Le vin est évaporé sous vide à 37 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif pour donner lieu à un résidu aqueux qui est ensuite extrait quatre fois à l'aide de l'acétate d'éthyle, ce dernier est évaporé et le résidu aqueux obtenu est lyophilisé.

2.8.2. Chromatographie sur colonne avec résine échangeuse de cation ; Dowex :

La poudre lyophilisée est soumise à la chromatographie sur colonne de Dowex (résine échangeuse de cation), La phase stationnaire est une résine sulfonate échangeuse de cations : DOWEX 50W-X8 (copolymère styrène + divinylbenzène, sur lequel sont greffés des groupes -SO3H) La résine fournie se trouve sous forme H^+, c'est à dire que tous les sites échangeables sont initialement occupés par des ions H^+. La granulométrie est de 50-100 mesh. L'élution a lieu d'abord avec de l'eau pour éliminer les glycérols et les sucres ensuite avec 75% de méthanol, à cette étape on ne vise pas à fractionner notre extrait mais on récupère le totum soluble dans le MeOH. Après évaporation du MeOH, on dissout l'extrait dans de l'eau et on le lyophilise, on obtient 0,8 g de poudre riche en polyphénols, le protocole est résumé sur la figure (2.7) ci-dessous.

2.8.3. Fractionnement par CPC

La poudre solide obtenu par le traitement précédent du vin rouge est soumise à la chromatographie de partage centrifuge en utilisant la même méthode adopté pour les sarments pour donner quatre fractions majeures (A-D) dans le mode ascendant alors que le mode descendant est récupéré et re-chromatographié en utilisant la CPC avec le même mélange de solvant quaternaire mais dans un rapport 3/3/5/4 (v/v). Cette fois le mode ascendant a donné lieu à trois fractions (α-γ) alors que le mode descendant n'a fourni qu'une seule fraction (δ, 0.0245 g). Le protocole est résumé dans la figure (2.8).

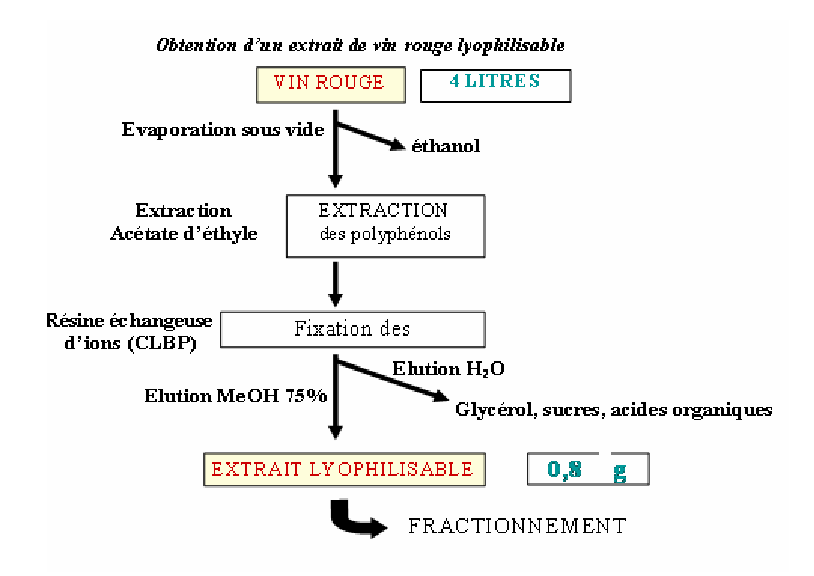


Figure 2.1 : Protocole de traitement du vin

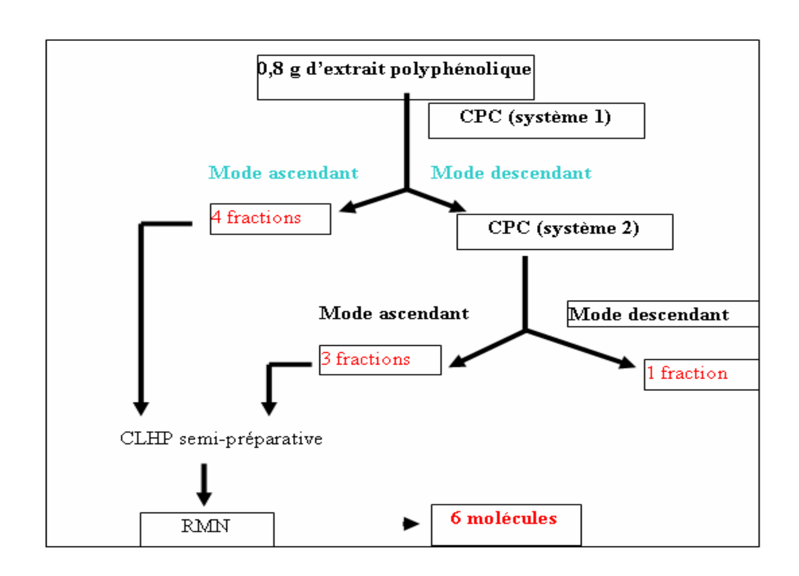


Figure 2.2: Protocole de purification de l'extrait phénolique obtenu

par traitement du vin Merlot

2.8.4. Purification des fractions β, δ, B et C par HPLC semi-préparative

La purification finale des fractions β et δ est achevée en utilisant l'HPLC semi-préparative avec les mêmes solvants utilisés pour la purification des fractions des sarments. Le gradient utilisé est comme suit: 20-50% B (0-35 min), 50-100% B (35-40 min), 100% B (41-46 min), 100-20% B (46-48 min), 20% B (48-53 min). La détection a lieu à 286 et 306 nm avec un détecteur à barrette de diode (Varian, model 335).

2.9. DOSAGE DES POLYPHENOLS DANS DES VINS DE L'AFRIQUE DU NORD :

2.9.1. Échantillons de vins étudiés

Dix vins de l'Afrique du nord (millésime 2003 et 2004) disponibles dans le commerce en France et en Algérie ont été analysés : Trois vins rouges algériens (Merlot, Cabernet Sauvignon et Cuvée du président*, un vin rosé (Gris d' Algérie*, du secteur de Médéa) et un blanc (muscat, d'ONCV Alger), quatre vins rouges Marocains (Sidi Brahim*, Ksar* et Guerrouane*, du secteur de Meknès ; Amjad*, du secteur d'Oujda), et un vin rouge tunisien (Terrale*, de la région de Carthage). * vins de mélanges

2.9.2. Standards

Les composés que nous avons purifiés à partir du Merlot et que nous avons dosés dans les dix variétés de vins cités précédemment sont : Le *trans*- resveratrol, le *trans*-picéide, la *trans*-ε-viniférine, le pallidol, l'hopéaphénol, et l'astilbin.

2.9.3. Préparation des gammes étalons

La solution mère est préparée à la base de 1mg de chacun des standards purs dans 1ml de solvant (50% ACN) les dilutions suivantes ont par la suite été effectuées : 200 µmol, 100 µmol, 75 µmol, 50 µmol et 25 µmol. Les courbes étalons sont ensuite tracées pour chacun des standards.

2.9.4. Analyses par HPLC

Les analyses ont été faites sur un appareil du type Agilent. Les solvants et le gradient utilisés sont les mêmes que ceux utilisés dans la section purification ci-dessus (tableau 2.1).

On prépare des cupules de 300 µl d'échantillon et on règle le volume injecté à partir du programme à 100 µL, après filtration sur une membrane Millipore de 0.45 µm. Après chaque analyse, la colonne est rééquilibrée avec la phase A pendant 10 min. Les longueurs d'onde de détection sélectionnées étaient 254 nm (caractéristiques des flavonoïdes), 280 nm, 286 nm (caractéristiques de certains tétramères et dimères), 306, et 330 nm (caractéristiques de dimères avec double liaison et monomère, tel que le resvératrol et le picéide).

La figure (2. 3) ci-dessous montre un chromatogramme HPLC analytique du mode descendant du système 2 de la CPC.

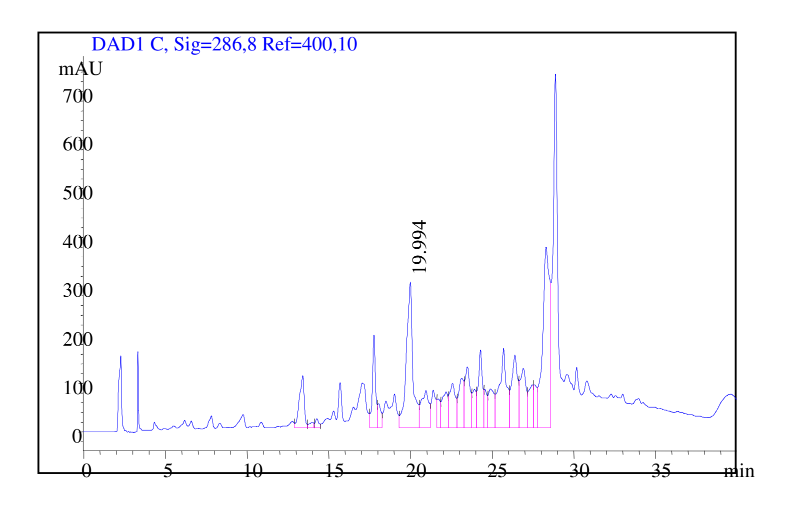


Figure 2.3 : **Vin merlot mode descendant fraction δ (système 2),**
Tr=19,994, Pallidol et Tr=28.8 hopéaphénol

2.9.5. Intégration

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres:

- la largeur attendue des pics
- le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

2.10. TEST ANTI-INFLAMMATOIRE

2.10.1. Test immuno-enzymatique

- *Mise au point du test*

Le test effectué est du type immuno-enzymatique (EIA) mesurant l'activité inhibitrice de nos composés sur la cyclooxygénase 1 et/ou 2par mesure quantitative des prostaglandines produites. Ce test s'effectue en deux étapes schématisées sur la figure (2.4).

a) Réaction de la cyclooxygénase

Trois réactions sont effectuées simultanément (figure 2.10). Un mélange réactionnel contenant la Cox dénaturée permet de mesurer le bruit de fond (A), un mélange contenant la COX active permettant de quantifier l'activité maximale de l'enzyme (B), et un mélange contenant la COX et la molécule d'intérêt permet de tester l'inhibition de la molécule (C).

Dans tous les tubes, nous disposons un tampon de réaction tris-HCL 0,1M, pH 8.0 (contenant 5mM d'EDTA et 2 ml de phénol), puis l(hème (1µm) et la COX -1 ou la COX-2 en quantité suffisante pour générer 1,5 µg de PGH_2/ml. Ces mélanges sont incubés pendant 10 minutes dans un bain marie) 37°C.

La réaction est initiée par l'ajout dans tous les tubes d'acide arachidonique (concentration finale de 100µM). L'incubation est de 2 minutes à 37 °C. La réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 50 µl d'HCL 1M. L'addition d'une solution de chlorure stanneux permet de réduire la PGH_2 produite en une prostaglandine plus stable, $PGF_2\alpha$.

b)Quantification des prostaglandines formées par la méthode ELISA

Les différentes réactions sont diluées au 1/2000ème grâce à un tampon phosphate de potassium (100 mM, PH 7,4), contenant 0,1% d'albumine bovine, 0,01 % d'azide de sodium et 0,9 mM de Na_4 EDTA. Puis 50 µl de réaction sont disposés par puits. Des immunoglobulines G (IgG) de chèvre anti-prostaglandines sont préfixées sur la plaque. Un traceur prostaglandine acétylcholinestérase et des anticorps de souris anti-prostaglandines sont ensuite ajoutés. A chaque réalisation du test, nous effectuons :

-Deux blancs,

-Deux puits pour mesurer la liaison maximale (traceur + IgG+ anticorps),

-Deux puits pour mesurer la liaison non spécifique (traceur +IgG),

-Un puits mesurant l'activité enzymatique totale (traceur),

-et une gamme étalon de 8 points préparée à partir d'un standard contenant 10 ng PGE_2/mL.

La plaque est alors incubée pendant 18 heures à température ambiante. Cinq lavages sont ensuite effectués par 200 µL de tampon phosphate de potassium (10mM, PH 7,4) contenant 0,01 %d'azide de sodium et 0,05 de Tween 20. Le réactif d'Ellman (200 µL) est ajouté dans tous les puits. Le réactif d'Ellman contient de l'acétylcholine qui, sous l'action de l'acétylcholinestérase,

se transforme en acide 5-thio-2-nitrobenzoique de couleur jaune absorbant à 405 nm. La plaque est incubée sous agitation rotative pendant 60 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance peut être mesurée à 405 nm lorsque la valeur des puits B0 est comprise entre 0,3 et 0,8 A.U (blancs soustraits).

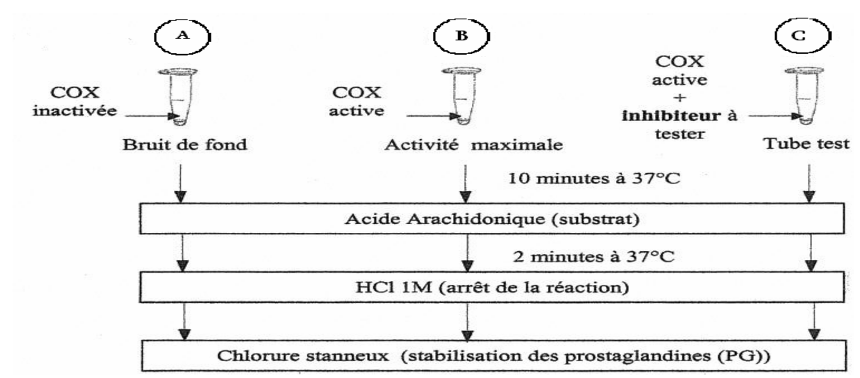


Figure 2.4: Test anti-inflammatoire ; réaction de la cyclooxygénase

Une courbe étalon représentant le pourcentage B/B_0 (liaison de l'échantillon standard par rapport à la liaison maximale) en fonction de la concentration en prostaglandines (pg/ml) permet de déterminer la concentration en prostaglandines de chaque échantillon en rapportant la valeur correspondante de pourcentage B/B_0. Le pourcentage d'inhibition de la COX de chaque concentration d'échantillon testée est calculée par rapport à l'échantillon contrôle (activité maximale de l'enzyme) et la détermination de l'IC50 s'effectue sur la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du produit.

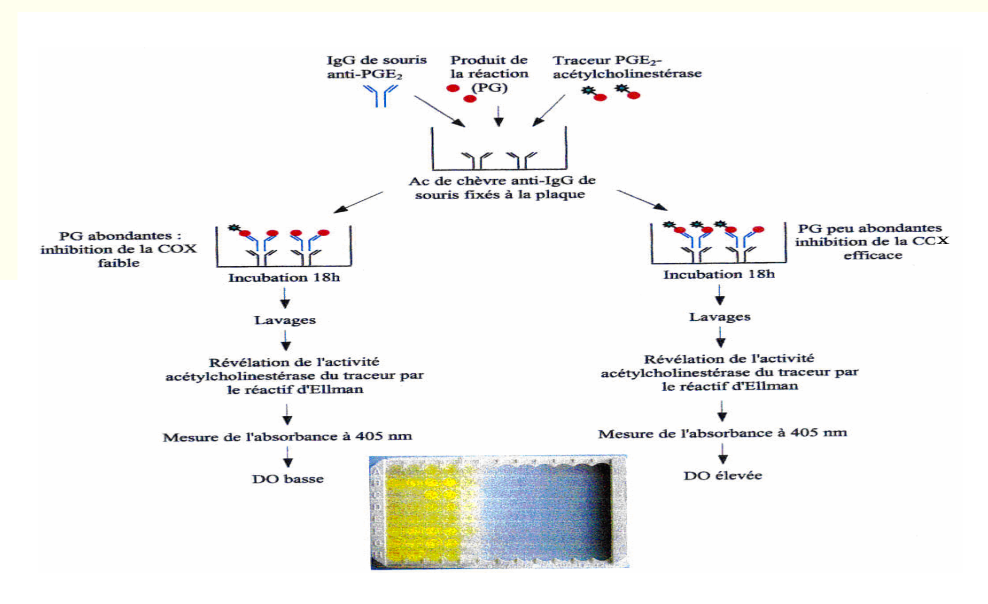


Figure 2.5: Mécanisme et réalisation du test EIA (essais immuno-enzymatique)

(Ac : anticorps ; COX : cyclooxygénase ; DO : Densité optique ;
IgG : immunoglobuline G ; PG : prostaglandines)

2.10.2. Production du Monoxyde d'azote

- *Détection de l'activité NO synthase inductible*

* Marquage au DAF-FM diacétate : dosage du NO intracellulaire

Le DAF-FM diacétate (4-amino-5-méthylamino-2'-7'-difluorofluorescéine diacétate, Molecular Probes) est un réactif permettant de quantifier de basses concentrations de NO (seuil de détection ≈ 5 nM). Ce composé diffuse de façon passive à travers la membrane plasmique, le diacétate permet au réactif de se fixer aux membranes cellulaires. Une fois à l'intérieur des cellules, les estérases intracellulaires coupent le diacétate libérant ainsi le DAF-FM (composé non fluorescent) qui va réagir avec le NO et aboutir à la formation de benzotriazole, composé fluorescent (λ excitation = 495, λ émission = 515 nm) détectable en cytométrie de flux.

Après 24 h d'activation et en présence des différents polyphénols, les cellules (3.10^6 CMN / condition) sont récupérées dans des tubes de 5 ml adaptables au cytomètre utilisé (XL, Beckman-Coulter). Après 2 lavages en PBS, le culot cellulaire est resuspendu dans 500 ml de milieu complet, puis le DAF-FM diacétate est ajouté à 10 µM final. Les cellules sont mises à incuber 1 h à 37°C à l'abri de la lumière, lavées en PBS puis le culot est resuspendu dans 250 µl de PBS. Une incubation de 30 min va permettre la fixation du DAF-FM au NO.

*Quantification du gène de l'iNOS par RT-PCR

a) - Extraction des ARN totaux

Après culture en boîte de Pétri, les cellules AKN-1 sont recueillies à l'aide d'un rateau stérile, lavées en PBS et transférées dans des tubes eppendorf. Le culot cellulaire est alors resuspendu dans le réactif d'extraction, le Trizol® (Life&Technologies) (1ml de Trizol® pour 10^7 cellules). Ce réactif est une solution monophasique de phénol et de guanidium de thiocyanate prête à l'emploi pour l'isolement d'ARN totaux à partir de cellules ou de tissus. Après incubation (15 min) et centrifugation, la phase supérieure est récupérée et incubée en présence de 0,1 v de chloroforme. Les ARN sont ensuite précipités par le l'isopropanol (v/v, 10 min), le culot est lavé avec de l'alcool à 75%, séché puis repris dans de l'eau DEPC.

b) - Contrôle de qualité des ARN

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille. L'agarose est dissous au four à micro-ondes dans du tampon TAE 1X (40 mM tris-Acétate, 1 mM EDTA pH=8) additionné de bromure d'éthidium (BET, intercalant de l'ARN et de l'ADN visible aux UV) à 0,2 µg/ml. Les échantillons sont mélangés au tampon de charge 6X (0,375 M

Tris, 60% glycérol, 12% SDS, 6% ß-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol) avant d'être déposés dans les puits. La migration est réalisée sur gel d'agarose 1% en TAE 1X à température ambiante et sous voltage constant (80 V). Les ARN sont visualisés sous UV.

c) -Dosage de la quantité d'ARN par spectrométrie

A partir d'une dilution au 1/100ème de l'ARN, les absorbances sont mesurées à 260 et 280 nm, ce qui permet de calculer la concentration d'ARN ainsi que le rapport DO^{260nm}/DO^{280nm}. La concentration d'ARN en µg/ml est obtenue grâce à la formule suivante : DO^{260nm} x 40 x dilution.

d) - RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) permet de détecter l'expression d'un gène (par la présence de son ARNm) grâce à une étape de rétro-transcription de l'ARN en ADN. Toutes les incubations sont effectuées dans le thermocycleur BioRad (iCycler Thermal Cycler), le matériel utilisé est RNAse-free. La première étape consiste à synthétiser l'ADN complémentaire simple brin à partir de l'ARN grâce à une réverse transcriptase. Le mélange réactionnel est composé de l'ARN total (1 µg), des oligonucléotides aléatoires amorces de la RT (0,1 µg, Roche) et d'un mélange équimolaire de déoxynucléotides (DNTP Mix, 10 nM, Roche). Le volume est complété à 12 µl final avec de l'H_2O nucléase-free. Le tout est incubé à 65°C pendant 5 min puis placé dans la glace 1 min. Après une centrifugation rapide, 7 µl/tube du Mix suivant sont ajoutés : tampon de la réaction RT (4 µl de 5X First strand buffer, Invitrogen), DTT (0,2 µM, Invitrogen) et un inhibiteur de RNAse (40 mU de Rnasin, Promega). Le mélange est incubé à 42°C pendant 2 min avant addition de la Reverse Transcriptase SuperScript II (200 U/réaction, Invitrogen). La synthèse de l'ADNc se fait pendant 50 min à 42°C puis une étape de 15 min à 70°C permet d'inactiver l'enzyme.

Le volume final de 20 µl est complété à 50 µl avec de l'H_2O nucléase-free préalablement à une PCR. La composition du mélange réactionnel de PCR et le protocole sont donnés dans le Tableau 15. La PCR va permettre d'amplifier un fragment de l'ADNc particulier parmi les différents ADNc obtenus par la RT, en l'occurrence des fragments de l'iNOS et le gène de l'HPRT (Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase, contrôle interne).

2.11. TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE

2.11.1. Principe du test:

Les cellules épithéliales coliques de type Caco-2 (ECACC 86010202) sont une lignée de cellules humaines adhérentes qui proviennent d'un adénocarcinome du côlon (Chantr ,1988; Jumarie, 1991) La viabilité des cellules caco2 est déterminée à l'aide d'un test colorimétrique

selon la technique de Mosmann et al (Mosmann, 1983). Le test, utilisant le bromure de 3-[4,5-diméthyl-2-yl]-2, 5,-diphényl-tétrazolium (MTT), consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT ; de couleur jaune, en cristaux de formazan de couleur bleue. Une lecture spectrophotométrique est réalisée et l'absorbance obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

2.11.2. Ensemencement

Les cellules Caco-2 sont ensemencés dans des boîtes 96 puits à raison de 10000 cellules par puit, dans 100 µl de milieu complet. Ces cellules sont maintenues pendant 24 heures dans l'incubateur. Le composé à tester est dilué dans un milieu complet à 1% de diméthyl sulfoxyde (DMSO), puis additionné, 24 heures après ensemencement, à différentes concentrations à raison de 100 µl par puits. Les cellules sont ensuite placées dans l'incubateur pendant des temps variables, de 2 à 48 heures.

2.11.3. Coloration et révélation

Une solution de MTT est présenté à 0,5 mg/ml dans un mélange DMEM/SVF (Dulbecco's modified Eagle's medium/ Sérum de Veau Fœtal) (95/5, v/v). Après le temps d'incubation choisi, le milieu est retiré par retournement rapide puis 200 µl de la solution de MTT sont additionnés et les cellules sont incubées à 37°C pendant 4 heures. La solution de MTT est retirée des puits et les cristaux de formazan formés sont dissous par 200 µl d'une solution de DMSO. Après 30 mn à température ambiante, l'absorbance est lue à 595 nm au spectrophotomètre.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 CARACTÉRISATION DES PRINCIPAUX COMPOSÉS ISOLÉS DES SARMENTS DE LA VIGNE

A partir des sarments de vigne cépage Merlot, nous avons isolés une vingtaine de molécules, la structure chimique de la plupart des composés a été déterminée en utilisant les méthodes spectroscopiques classiques RMN du proton, corrélations 2D (HMBC, HSQC, NOESY, ROESY) (voir annexe B) et dans certains cas nous avons déterminée le pouvoir rotatoire, la spectroscopie de masse permet de confirmer la structure proposée (les spectres RMN et de masse seront présentés en annexe C), les données spectrales seront ensuite comparées aux résultats publiés. Par contre quelques molécules posent problème vu que la masse ne coïncide pas avec la structure déterminée et des expériences d'RMN et/ou des méthodes chimiques sont encore nécessaires pour confirmer ces structures.

3.1.1. Polyphénols du mode ascendant :

La fraction de CPC 33-60 du système 2, a été soumise à la chromatographie sur gel de Sephadex LH20 puis à la repurification par HPLC semi-préparative. La figure (3.1) représente un chromatogramme HPLC des composés identifiés dans cette fraction, les figures (3.2) et (3.3) montrent deux plaques CCM de ces composés (révélation à l'anisaldéhyde).

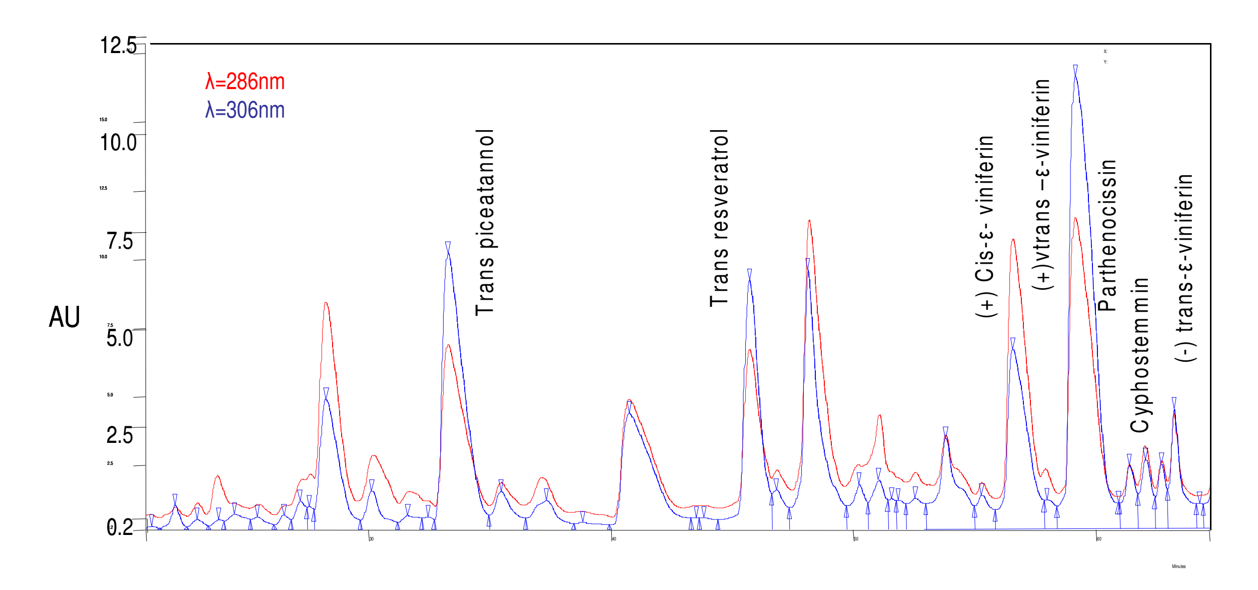


Figure 2.1: Chromatogramme HPLC de la fraction 33-60

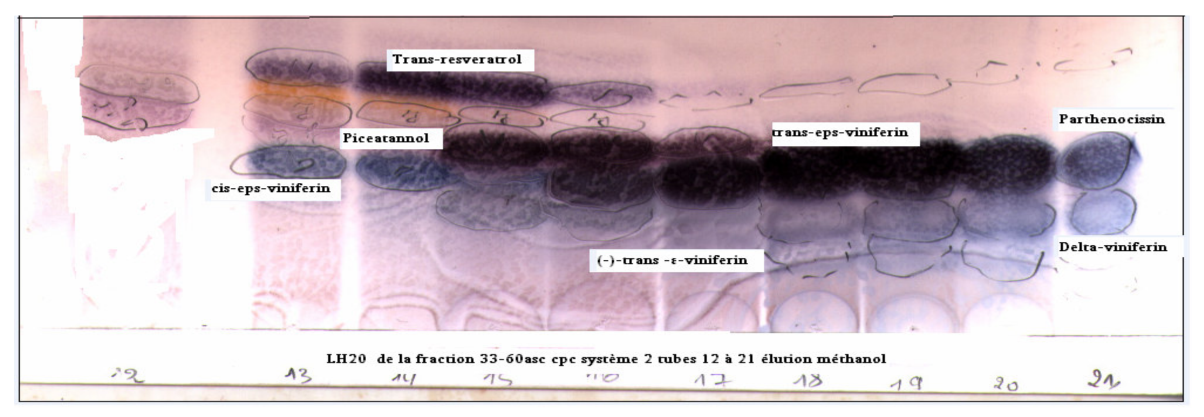


Figure 2.2: Plaque CCM des principaux composés du mode ascendant fraction 33-60

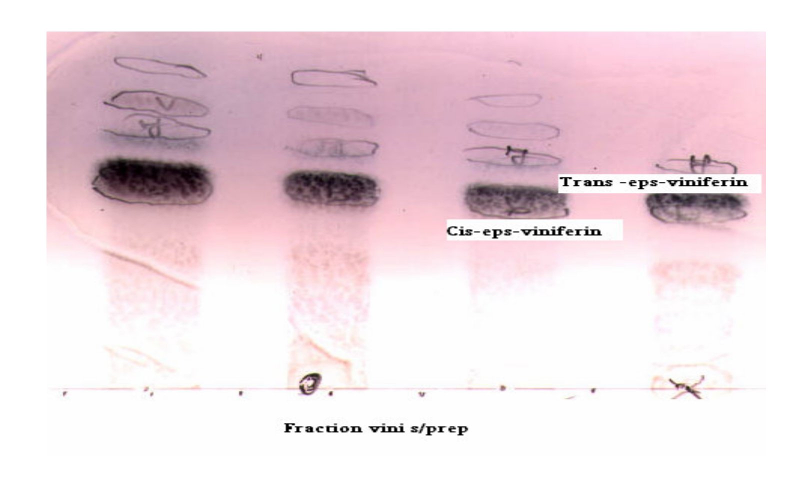


Figure 2.3: **Fraction des vinifèrines (purification semi-prép.)**

❖ ***Monomères***

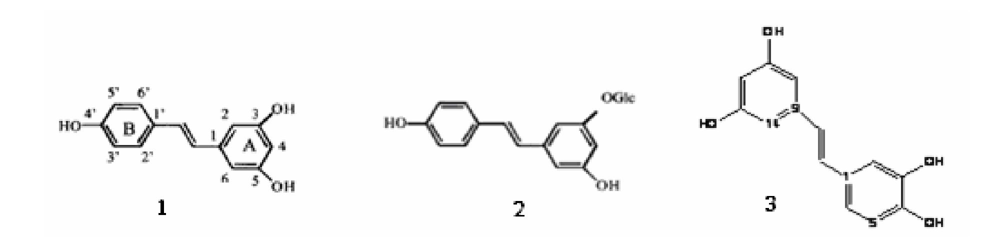


Figure 2.4: Structure des monomères, 1, trans resvératrol,
2, trans picéide, 3 trans picéatannol

- ***Trans*-resveratrol**

Formule brute : $C_{14}H_{12}O_3$

Masse m/z = 228

Parmi les stilbènes, le trans resveratrol figure (3.4,1) est le composé majoritaire (≈ 100 mg/1 Kg) des sarments. Concernant sa structure, le spectre proton du resvératrol isolé à partir des sarments a été comparé à un échantillon commercial. Les effets thérapeutiques diverses de cette

molécule ont été discutés dans l'introduction. Nous sommes arrivés à cristalliser cette molécule (MeoH) et nous avons pu déterminer sa structure absolue 1,3-Benzenediol, 5-[(1E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]- (9CI). Son point de fusion est de (258-260 °C).

- ***Trans* picéatannol** (Formule brute : $C_{14}H_{12}O_4$, Masse m/z= 244)

Le picéatannol ou *trans*-3,4,3',5'-tetrahydroxystilbène (figure 3.4,3) a été isolé pour la première fois des graines d'Euphorbia *lagascae, (Euphorbiaceae)* (Ferrigni, 1984). Le picéatannol est un anti-inflammatoire (Matsuda, 2000) un immunomodulatoire et antiprolifératif (Su, 2000, Wolter, 2002 Being-Sun ,2006).

Le picéatannol, a aussi été reporté comme antileucémique en inhibant sélectivement la tyrosine kinase Syk (Spleen Tyrosine Kinase). De plus, le traitement des cellules myéloïdes humaines avec du picéatannol a permis la suppression de l'activité du facteur NF-κB (nuclear transcription factor). Potter et all (Potter, 2002) ont démontré la conversion du resvératrol en picéatannol par l'enzyme cytochrome P450 CYP1B1 exprimée dans plusieurs types de tumeurs. Une étude a montré que le picéatannol est un inducteur efficace de l'apoptose dans des essais in vivo sur des patients atteints de la leucémie lymphoblastique de l'enfance. Le picéatannol a aussi été testé en utilisant le plasma isolé de souris et a montré un effet inhibiteur de l'activité α-amylase ce qui permet de s'attendre à une activité antidiabétique pour ce composé (Kobayashi, 2006). Matsuda et al (Matsuda ,2004) ont reporté l'activité antiallergique du picéatannol. L'activité antioxydante, pro-oxydante, et cytotoxique du trans picéatannol ont été reporté par Murias et al. (Murias, 2005). L'activité anti-inflammatoire et antiproliférative du picéatannol ont été reportées par plusieurs auteurs parmi lesquels Wung et al. (Wung, 2006).

- ***Picéide (polydatin)***

Formule brute : $C_{20}H_{22}O_8$ (5-4'-dihydroxystilbène-3-beta-D-glucopyranoside, Masse m/z= 390
Point de fusion : 223-226°C, [α] D= -55° (c=1, acétone).

Le picéide, glucoside du resvératrol a été trouvé dans les suspensions cellulaires de vigne par Waffo-Tueguo et al. (Waffo-Tueguo, 2001). Concernant les activités biologiques du picéide, il a été reporté comme anti-inflammatoire mais qu'à des concentrations de 1000 µMol (Kimura et al, 2000). Le picéide possède un effet inhibiteur de la prolifération de tumeurs de poumons et des métastases chez la souris à 1000 µmol (Uldrich, 2005). De même, le picéide a la propriété d'inhiber la différenciation des lignées cellulaires endothéliales (HUVECs) et donc l'angiogénèse (Néoformation de vaisseaux capillaires, dans le cas d'une tumeur, elle est induite directement ou indirectement par les cellules tumorales) pour des concentrations de l'ordre de 100 à 1000 µMol (Kimura, 1985). Les auteurs suggèrent que les effets anti-tumoraux et anti-métastasique des picéides pourraient être liés à l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les

cellules cancéreuses et à l'inhibition de l'angiogénèse des lignées HUVECs (Kimura, 2005).

- ***Dimères du resvératrol avec un noyau furane (viniférines):***
  - *Avec 5 groupements hydroxyles*

Tableau 2.1: données RMN des dimères (viniférines)

δ-viniférine			(+)trans ε-viniférine			(-) trans ε-viniférine		(+) cis ε-viniférine		
No	δ_H, J (Hz)	δ_C	No	δ_H, J (Hz)	δ_C	No	δ_H, J (Hz)	No	δ_H(ppm) , J (Hz)	δ_C (ppm)
1a		94.94	1a		133.8	1a		1a		129.4
2(6)a	7.23 *d* (8.7)	58.00	2(6)a	7.19 *d* (8.5)	127.8	2(6)a	7.22 *d* (8.6)	2(6)a	7.17 *d* (9)	130.3
3(5)a	6.84 *d* (8.7)	132.87	3(5)a	6.83 *d* (8.5)	116.1	3(5)a	6.76 *d* (8.6)	3(5)a	6.92 *d* (9)	114.2
4a		131.26	4a		158.2	4a		4a		158.7
7a	5.44 *d* (8.1)	124.18	7a	5.42 *d* (5.5)	93.7	7a	5.87 *d* (5.7)	7a	5.4 *d* (5)	88.1
8a	4.46 *d* (8.1)	132.87	8a	4.45 *d* (5.5)	57.2	8a	4.70 *d* (5.7)	8a	4.11*d* (5)	49.9
9a		128.68	9a		147.3	9a		9a		141.9
10(14)a	6.18 *d* (2.1)	110.38	10(14)a	6.24 *bs*	106.9	10(14)a	5.82 *d* (2.1)	10a		121.5
11a		161.05	11(13)a		159.6	11a		11a		159.3
12a	6.27 *t* (2.1)	129.39	12a		102.0	12a	5.98 *t* (2.1)	12a	6.38 *d* (2.1)	100.3
13a		127.48			129.8	13a		13a		156.3
1b		132.87	1b	6.25 *bs*		1b		14a	6.21 *d* (2.1)	104.8
2(6)b	6.52 *d* (2.1)	128.68	2(6)b	7.16 *d* (8.6)	128.6	2(6)b	7.03 *d* (8.6)	1b		136.1
3b		116.34	3(5)b	6.74 *d* (8.6)	116.2	3(5)b	6.62 *d* (8.6)	2(6)b	6.89 *d* (8.6)	128.9
4b	6.25 *t* (2.1)	158.77	4b			4b		3(5)b	6.54 *d* (8.6)	113.9
5b		159.98			158.2			4b		156.2
7b	6.89 *d* (16.1)	102.5	7b	6.67 *d* (16.0)	123.5	7b	6.75 *d* (16.4)	7b	5.75 (12,2)	40.0
8b	7.05 *d* (16.1)	107.75	8b	6.89 *d* (16.0)	130.1	8b	6.95 *d* (16.4)	8b	3.86 (12,2)	48.2
9b		145.39	9b		136.4	9b		9b		140.2
10b	7.25 *br s*	141.19	10b		119.7	10b		10b		118.6
11b		105.82	11b		162.4	11b		11b		159.2
12b		159.67	12b	6.32 bs	96.7	12b	6.37 *d* (2.0)	12b	5.72 *d* (2.1)	84.2
13b	6.86 *d* (8.3)	102.74	13b		159.5	13b		13b		156.4
14b	7.42 *dd* (8.3, 1.7)	94.94	14b	6.70 bs	104.2	14b	6.73 *d* (2.0)	14b	5.07 *d* (2.1)	110.4

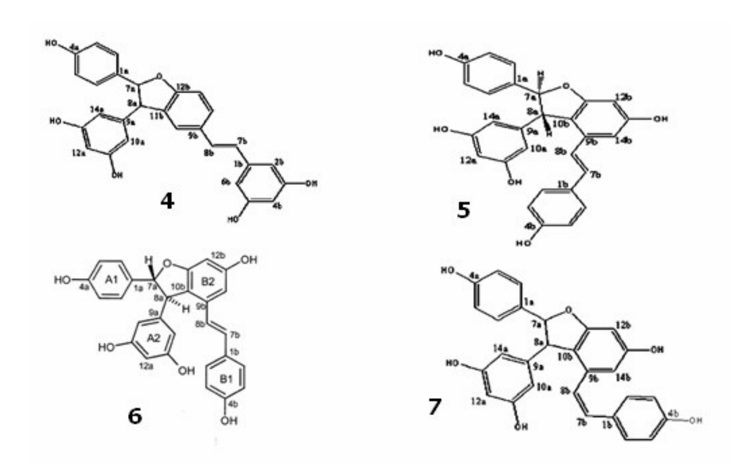


Figure 2.5: Structure des dimères du resvératrol isolés à partir du mode ascendant CPC système 2 ; 4 : δ-viniférine, 5: (+) trans ε-viniférine, 6 : (-) trans ε-viniférine, 7 : cis ε-viniférine

- ***<u>δ-viniférine</u>***

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

SM (ESI) (*m/z*): 453 $[M-H]^-$; 435 (MS2) $[M-H-H2O]^-$

- Les données RMN (tableau 3.4) montre un système aromatique complexe entre 6,0 et 7.4 ppm, correspondant à 15 protons, dont deux appartiennent à un système oléfinique.
- Grâce à leur constante de couplage de 16.1 Hz (H7' et H8'), on peut déduire la présence d'une double liaison *trans*.
- Nous pouvons observer un couplage AA'BB', présent sous la forme de doublets de doublets avec une constante de couplage de 8.7 à 7.23 et 6.84 ppm (H2 (6) et H 3(5)).
- Deux systèmes doublet/triplet avec une constante de couplage de 2.1 Hz, correspondant à 6 hydrogènes, nous font suggérer un double système aromatique *ortho*/*para*.
- Les signaux à 7.42, 7.25 et 6.86 ppm (H14b, H10b, H13b) nous indiquent la présence d'un cycle aromatique trisubstitué. Le proton à 7.42 ppm est couplé au proton à 6.84 ppm avec une constante de couplage de 8.3 Hz, (couplage *ortho* sur le noyau benzénique). Il est aussi faiblement couplé (J3=1.7 Hz) avec le proton à 7.25 ppm, indiquant que ces hydrogènes sont en *méta* l'un de l'autre.

- Deux autres hydrogènes, avec des constantes de couplage identiques à 5,44 et à 4,46 (d, 8.1 Hz), ont des déplacements chimiques un peu trop faibles pour appartenir à un système aromatique, mais suffisants pour être placé près d'un centre électronégatif, comme par exemple l'oxygène. Ceci permet de suggérer la présence d'un éther cyclique, reliant les différents systèmes entre eux.

Les données spectrales de ce composé ont été comparées à celles de la δ-viniférine (figure 3.5, 4) publiées et étaient en parfait accord (Perret, 2001).

<u>(+)-trans-ε-viniférine</u>

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$
Poids moléculaire : 454 g/mol
SM (ESI) (*m/z*) : 453.7 [M-H]-
Pouvoir rotatoire, [α] D : +41,9°

Les données RMN (tableau 3.1) nous suggère que ce composé appartient à la même classe que le resvératrol *trans*-déhydrodimère (***δ-viniférine***)

- Nous observons un seul système *ortho*/*para* à 6.25 et 6.24 ppm (H12 et H10, H14), correspondant à 3 hydrogènes. Les signaux à 6.67 et 6.89 ppm, avec un couplage de 16.0

Hz, nous indiquent la présence d'une double liaison *trans* (H7'-H8').

- Nous pouvons observer la présence de deux systèmes AA'BB', indiquant une substitution *para* sur les cycles aromatiques (H2(6), H3(5) et H2' (6'), H3' (5').
- Deux hydrogènes, représentés par des doublets à 5.42 et 4. 45 ppm avec une même constante de couplage de 5.5 Hz, nous indiquent un système central semblable à la δ-viniférine (H7 et H8).
- Les signaux à 6.63 et 6.24 ppm apparaissent sous la forme de doublets avec une constante de couplage de 1.9 Hz, correspondant à un couplage *méta* (H12', H14'). Le spectre 13C-RMN montre plusieurs carbones très déblindés pouvant être attribués à des phénols. Nous pouvons en conclure que la structure est très proche du resvératrol *trans*-déhydrodimère, mais avec des variations au niveau des substituants aromatiques.

Au vue de ces résultats et par comparaison avec la littérature, la structure de ce composé a été déduite comme étant la (+) t*rans* ε-viniférine **(figure 3.5, 5).**

Ce composé a pour la première fois été isolé de *Vitis vinifera* en 1977 par P. Langcake (Langcake, 1977b). Il a ensuite à nouveau été isolé de la vigne par W.-W. Li en 1996 (Li, 1996) et de *Gnetum parvifolium* en 1992 par *M. Lin* (Lin, 1992). Ce stilbène dimèrique est produit par les processus d'oxydation du resveratrol. La viniférine est aussi produite par la vigne en réponse à l'attaque fongique (Langcake, 1981).

La viniférine a non seulement une meilleure activité antifongique mais également de meilleures pouvoirs antioxydants que le resveratrol (Baderschneider, 2000; Bala, 2000). Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *Vitis coignetiae* (Vitaceae) guidé par l'activité hépato-protectrice a conduit à l'isolement de l'ε-viniférine comme principe actif (Oshima, 1995). Selon Piver et al (Piver, **2003)**, la *trans ε*-viniférine a montré des effets inhibiteurs des enzymes des cytochromes P450 humains impliquées dans la bioactivation de nombreux carcinogènes. La *trans*-ε-viniférine, possède une activité antioxydante (Privat, 2002) et anti-hépatotoxique (Langcake, 1976).

(-) trans-ε- viniférine

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

SM (ESI) (*m/z*) : 453.7 [M-H]-

Pouvoir rotatoire, [α] D : - 41,9°

Cette molécule est aussi un dimère du resvératrol. L'analyse des données RMN (tableau 3.1) nous indique que ce composé est de nature très voisine (+) *trans* ε-viniférine décrite dans le paragraphe précédent.

En effet, sur le spectre du proton (tableau 3.4) nous observons :

- Deux systèmes AA'BB' représentés par les deux couples de doublets H2, H6 à 7,15ppm (d=2H, J=8,5Hz) et H3, H5 à 6,69 ppm (d, 2H, J=8,5) ainsi que H2', H6' à 6,69 ppm (d, 2H, J=8,5 Hz) et H3', H5' à 6,57 ppm (d, 2H, j=8,5Hz),
- Un système éthylénique de type *trans (*grande constante de couplage), caractérisé par deux doublets à 6,87 et 6,68 ppm (J=16,4 Hz) correspondant respectivement à H8' et H7',
- Un système AX2, composé d'un triplet à 5,49 ppm correspondant à H12 et d'un doublet à 5,77 ppm (J=1,7) correspondant à H10 et H14,
- H12' et H14' sont représentés par deux doublets (J=2,1 Hz) à 6 ,66 et 6,32 ppm, à 5,58 et à 4,6 ppm, deux doublets (J=8,1 Hz) correspondant aux protons H7 et H8.

(+)-cis-ε-viniférine

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

SM (ESI) (*m/z*) : 453.7 [M-H]-

Ce composé possède presque les mêmes caractéristiques que la trans ε-viniférine (tableau 3.1). La constante de couplage entre 7b et 8b (J = 12.1 Hz) laisse penser à une liaison oléfinique en cis. Il s'agit donc de la cis ε-viniférine (Figure 3.5, 7), la présence de la (+)-*trans*-ε-viniférine en faible quantité confirme cette attribution et explique la difficulté de séparer ces deux composés, leur temps de rétention étant très proches. Pour prouver que la cis ε-viniférine est un constituant des sarments tout autant que la forme *trans* et non une isomérisation de celle-ci, nous avons laissé les deux produits purs en solution à température ambiante, pendant un mois, leur analyses par HPLC a montré l'isomérisation de la forme cis en *trans* (lente et irréversible) alors que l'inverse n'a pas été observé.

En plus, l'existence de cette forme de la viniférine chez la vigne *(vitis vinifera)* a déjà été signalée auparavant mais n'a jamais été isolée de la vigne. Par contre, elle a été identifiée chez une autre plante de la famille des Vitaceaes ; *cyphostemma crotalarioides* (Bala, 2000) et dans les graines de *Paeonia lactiflora pal.* (Paeoniaceae) (Kim, 2002). Concernant les activités biologiques de la cis- ε-viniférine, elle a été reportée comme antifongique (Bala, 2000) et possède un pouvoir antioxydant (Kim, 2002).

- *Avec six groupements hydroxyles :*

trans-scirpusin A

8

Figure 2.6: *trans*-scirpusin A (8)

Formule brute : $C_{28} H_{22} O_7$

Mase m/z= 470 g/mol

Le spectre RMN de cette molécule montre qu'elle est de même nature que la (+) *trans*-ε-viniférine (figure 3.5, 5), la seule différence c'est l'existence d'un hydroxyle à la place du proton 3a. Cette molécule est la *trans* scirpusin A (Figure 3.6)

Tableau 2.2: Données ^{1}H et ^{13}C de la *trans*-scirpusin A (HA 93), solvant acétone-d_6.

No	δ_H, *J* (Hz)	δ_C
1a		133.9
2a	6.83 *d* (2.1)	113.7
3a		144.5
4a		145.0
5a	6.81 *d* (8.0)	116.9
6a	6.70	117.1
7a	5.36 *d* (5.1)	93.9
8a	4.45 *d* (5.1)	56.5
9a		146.7
10(14)a	6.24 *s*	107.2
11(13)a		159.2
12a	6.24 *s*	101.6
1b		129.5
2(6)b	7.18 *d* (8.6)	129.1
3(5)b	6.73 *d* (8.6)	116.6
4b		158.4
7b	6.71 *d* (16.4)	123.8
8b	6.91 *d* (16.4)	130.4
9b		133.9
10b		119.0
11b		161.7
12b	6.32 *d* (2.1)	96.6
13b		159.0
14b	6.70 *d* (2.1)	104.2

La scirpusin A, a été identifiée dans des rhizomes de *Scirpus Californicus (Cyperaceae)* par Schmeda-Hirschmann et al. (Schmeda-Hirschmann, 1996) qui ont montré que la scirpusin A et B étaient des inhibiteurs de la Xanthine oxidase (XO). Les scirpusins A et B ont aussi été isolées à partir de *Caragana rosea Turcz (Papilionaceae, Fabaceae)* plante native de l'Asie (Chine). Des études *in vitro* contre des HIV-1 (IIIB), ont démontré que ces deux composés sont actifs contre ce virus avec des IC50 de 10 µmoL et 7 µmoL respectivement (Yang, 2005).

❖ ***Dimères du resvératrol sans le noyau furane, avec présence de six hydroxyles***

Figure 2.7: Dimères sans noyau furane; 9 : Parthénocissine A, 10 : Cyphostemmin B, 11 : Ampelopsin D

▪ ***Parthénocissine***

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

Masse (*m/z*) : 454

Le spectre de proton de la parthénocissine (Figure 3.7, 9) montre :

- Quatre doublets correspondant à deux systèmes AA'BB' représentés par les protons H2', H6' et H3', H5' (7, 19, et 6,78 ppm) du cycle D d'une part, et H2, H6, et H3, H5 (6,59 et 6,7 ppm) du cycle B d'autre part,
- Un système AX2, sur un cycle trisubstitué (A) en 9,11 et 13 caractérisé par deux multiplets larges (H14 et H10) et (H12)
- Deux doublets correspondant à deux protons (H12' et H14') couplant en *méta* sur un cycle tetrasubstitué (C) en 9', 10',11', et 13',
- Deux protons aliphatiques à 4,18 et 3,69 ppm représentés par deux singulets larges, correspondant respectivement à H7 et H8,
- enfin, un singulet large à 6,23 ppm représentant un proton éthylénique ne couplant avec aucun autre proton,

Les corrélations HMBC permettant d'établir la structure de ce composé sont les suivantes

- Le carbone C7 à 60 ppm corrèle avec les protons H2 et H6 du système AA'BB',
- Le carbone C8 à 69,8ppm montre un couplage longue distance non seulement avec H10 et

H14 du système AX2 mais aussi avec le proton éthylénique H7',

- Un seul couplage en J4 est observé, représenté par la corrélation entre le carbone C7' et le proton H7.

Ces données sont en parfait accord avec la littérature (Tanaka ,1998)

- ***Cyphostemmin B***

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

A partir du spectre ^{1}H RMN (Tableau 3.3), certaines caractéristiques communes aux dimères de resvératrol ont été aisément identifiées : Deux cycles aromatiques disubstitués en *para*, un cycle benzénique trisubstitué en *méta* et un cycle aromatique tetrasubstitué. Des résonances supplémentaires ont été observées pour un proton porté par un carbone sp^2 et deux protons aromatiques faiblement couplés déplacés à de faibles valeurs du champ. Des expériences NOESY ont été effectuées en vue de compléter l'attribution des protons.

Tableau 3.3: données ^{1}H et ^{13}C de la Cyphostemmin B et de l'ampelopsin D. Solvant acétone-d_6.

Cyphostemmin					***Ampelopsin D***	
No	**δH, J (Hz)**	**δC**	**HMBC (C→H)**	**N°**	**δ_H, *J* (Hz)**	**δ_C**
1a	-	136.4	3(5)a, 7a, 8a	1a	-	136.0
2(6)a	6.92 d	127.4	7a	2(6)a	7.12 d	127.4
3(5)a	6.66 d	114.4	2(6)a	3(5)a	6.75 d	114.9
4a	-	155.1	2(6)a, 3(5)a	4a	-	155.3
7a	4.27 brs	56.3	2(6)a, 8a	7a	4.29 brs	58.1
8a	4.15 brs	59.3	10(14)a, 7b	8a	4.15 brs	57.3
9a	-	146.7	7a, 8a	9a	-	148.0
10a	6.30 d	104.9	8a, 12a	10a	6.11 brs	105.1
11a	-	158.4	12a, 10(14)a	11a	-	159.7
12a	6.19 t	101.9	10(14)a	12a	6.11 brs	99.9
13a	-	158.4	12a, 10(14)a	13a	-	159.7
14a	6.30 d	104.9	8a, 12a	14a	6.11 brs	105.1
1b	-	128.3	3(5)b	1b	-	128.3
2(6)b	7.21 d	129.7	7b	2(6)b	7.18 d	129.7
3(5)b	6.68 d	114.6	2(6)b	3(5)b	6.65 d	114.6
4b	-	155.9	2(6)b, 3(5)b	4b	-	155.9
7b	7.04 brs	121.5	2(6)b, 8a	7b	7.04 brs	121.3
8b	-	141.3	7b, 14b, 7a, 8a	8b	-	141.8
9b	-	145.8	7b, 7a, 8a	9b	-	146.1
10b	-	123.1	12b, 14b, 7a, 8a	10b	-	122.5
11b	-	154.6	12b, 7a	11b	-	154.8
12b	6.29 d	102.4	14b	12b	6.31 d	102.4
13b	-	158.3	12b, 14b	13b	-	158.4
14b	6.79 d	97.0	12b	14b	6.81 d	97.0

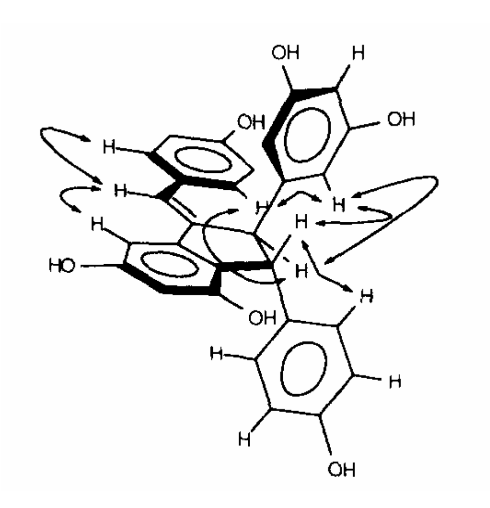


Figure 2.8: Expérience NOESY de la cyphostemmin B

La dimérisation tête à queue a été confirmée par les NOE'S suivantes (Figure 3.8) 10'→7'→2'→14 →8 →2. Une caractéristique unique qu'on ne trouve pas dans les autres dimères du resvératrol,(ex. viniférines), est l'existence d'un CH_2 benzylique où les deux protons sont magnétiquement équivalents. La structure de la cyphostemmin B (Figure 3.7, 10) proposée est en parfait accord avec celle publiée (Ducrot, 1998) et qui fût isolée pour la première fois à partir de *Cyphostemma crotalarioides* (Vitaceaes) en 1998, cette dernière référence a aussi rapporté l'activité antifongique de la cyphostemmin B.

- ***Ampelopsin D***

Les données RMN (tableau 3.3) montre la similarité avec la cyphostemmin B, la comparaison avec la littérature (Ducrot, 1998) a permis l'élucidation structurale de cette molécule comme étant l'ampelopsin D (figure 3.7, 11).

3.1.2. Polyphénols du mode descendant

❖ ***Dimères***

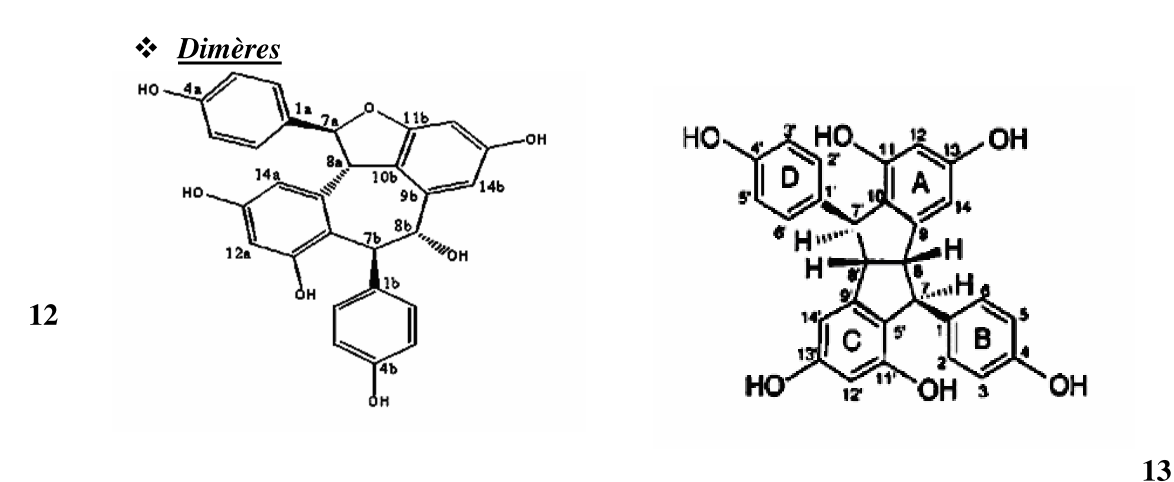


Figure 2.9: Dimères du resvératrol du mode descendant ; 12 : (+)-ampelopsin A, 13 : Pallidol

Tableau 2.4: Données ^{1}H et ^{13}C (+) ampelopsin A, isomère ampelopsin A (acétone d_6), pallidol (MeOD)

Ampelopsin A		*Isomère ampelopsin A*			*Pallidol*	
No	**δ_H, J (Hz)**	**No**	**δ_H, J (Hz)**	**δ_C**	**No**	**δ_H, J (Hz)**
1a		1a		131.2	1a	
2(6)a	7.03 *d* (8.6)	2(6)a	7.10 *d* (8.6)	128.9	2a	6.87 *d* (2)
3(5)a	6.69 *d* (8.6)	3(5)a	6.76 *d* (8.6)	116	3	
4a		4a		158.8	4a	6.39 *d* (2)
7a	5.71 *d* (11.3)	7a	5.75 *d* (11.5)	89.1	7a	3.77 *d* (7)
8a	4.03 *d* (11.3)	8a	4.15 *d* (11.5)	49.7	8a	4.5 *s*
9a		9a		143	9a	
10a		10a		119.1	10 a	
11a		11a		159.2	11a	
12a	6.32 *d* (2.2)	12a	6.42 *d* (2.2)	101.5	12a	
13a		13a		159.9	13a	
14a	6.11 *br s*	14a	6.22 *br s*	105	1b	
1b		1b		133.1	2(6)b	6.93 d (8.5)
2(6)b	6.83 *d* (8.4)	2(6)b	6.88 *d* (8.6)	128.9	3(5)b	6.66 d (8.5)
3(5)b	6.58 *d* (8.4)	3(5)b	6.63 *d* (8.6)	115.1	4b	
4b		4b		156	7b	
7b	5.39 *d* (4.8)	7b	5.44 *d* (4.8)	43.8	8b	
8b	5.37 *d* (4.8)	8b	5.40 *d* (4.8)	71.5	9b	
9b		9b		140	10b	
10b		10b		118.5	11b	
11b		11b		160.7	12b	
12b	6.11 *d* (2.2)	12b	6.14 *d* (2.2)	97.3	13b	
13b		13b		158.8	14b	
14b	6.53 *d* (2.2)	14b	6.59 *d* (2.2)	110.6		

- ***(+)-ampelopsin A***

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_7$, masse : 470 g/mol

Le spectre du proton nous donne les informations suivantes (tableau 3. 7):

- Un doublet à 7,03 ppm (2H, *J*=8,6 Hz) dont les protons sont couplés avec ceux d'un second doublet à 6,69 ppm (2H, *J*= 8,6). Ceci correspond à un système de spins AA'BB' d'un cycle aromatique bisubstitué en para et donc respectivement aux protons H2 et H6 couplés avec H3 et H5 du cycle B,
- De même les protons H2' et H6' (d, 2H, *J*=8,8 Hz) sont couplés avec les protons H3' et H5' (d, 2H, *J*=8,4 Hz) sur le cycle D,
- Le proton à 6,11 ppm (d, 1H, *j*=2,2Hz) couple avec le proton à 6,53 ppm (d, 1H, *J*=2,2Hz). La faible constante de couplage indique que ces protons correspondent aux hydrogènes aromatiques couplés en *méta*, soit H12' et H14'. De même le proton H12 à 6,32ppm (d, 1H, j= 2,2 Hz) couple avec H14 à 6,11ppm (br s, 1H)
- Les signaux à 5,71 ppm (d, 1H, j= 11,8 Hz) et 4,03 ppm (d, 1H, j= 11,8 Hz) sont caractéristiques de protons aliphatiques appartenant à un cycle oxygéné et donc ici à H7 et H8, respectivement,
- Les signaux à 5,39 ppm (d, 1H, j= 4,8 Hz) et 5,37 ppm (d, 1H, j= 4,8 Hz) correspondent aux protons H7' et H8', respectivement.

Cette molécule est bien l'ampelopsin A (figure 3.9, *12*). L'activité biologique de cette molécule n'a pas été reportée mais son acétate a montré une activité cytotoxique importante

(Masayoshi, 1999).

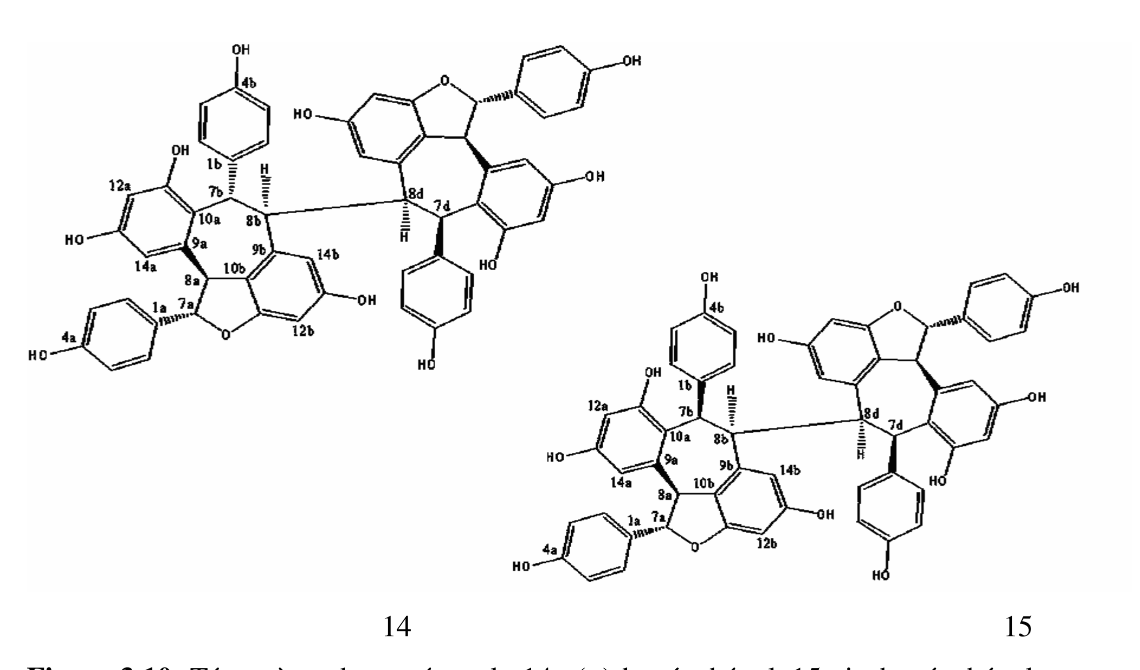
- ***Isomère ampelopsin A (non entièrement identifié)***

Le spectre du proton de ce composé est identique à celui de l'ampelopsin A mais les temps de rétention ainsi que l'aspect physique des 2 composés sont différents.

- ***Pallidol :*** Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$, Masse : 454 g/mol

Le spectre de proton du pallidol (tableau 3.7) montre quatre protons aliphatiques à δ 3.77 et 4.50 ppm (deux singulets larges) et deux systèmes AA'BB' caractérisés par deux paires de doublets de protons à δ 6.66 et 6.93 ppm (j, 8.5 Hz) correspondant aux protons des cycles aromatiques B et D, et par deux paires de doublets de protons à δ 6. 39 et 6.87 ppm (j, 2 Hz) correspondant aux cycles A et C. Ces données RMN sont identiques à ceux publiées par Khan et al. (Khan, 1986). Le pallidol étant symétrique, on ne voit sur le spectre proton que les signaux correspondant à la moitié de la molécule. C'est le spectre de masse qui a permis de confirmer la structure du pallidol (3.15, 13) et a donné une masse M/Z 454 $[M+H]^+$correspondant à un dimère du resvératrol. Le pallidol a été isolé pour la première fois à partir de *Cissus Pallida (Vitaceaes)* et est un composant naturel de *Vitis Vinifera*, Waffo-Teguo et al. ont isolé le pallidol à partir des cultures cellulaires (Waffo-Teguo, 2001). Les activités inhibitrices de la cyclooxygénase 1 and -2 (COX-1 and -2) ont été étudiées pour le pallidol et ont indiqué qu'il était inactif contre les deux isoformes de l'enzyme (IC50 > 70 mg/mL) (Waffo-Teguo and al, 2001). L'activité anticancéreuse a été aussi étudiée mais était négligeable (Masayoshi et al, 2005).

<u>Tétramères</u> Formule brute : $C_{56}H_{42}O_{12}$, Masse: 906 g/mol



14 15

Figure 3.10: Tétramères du resvératrol ; 14 : (+)-hopéaphénol, 15 : isohopéaphénol

- ***(+)-Hopéaphénol***

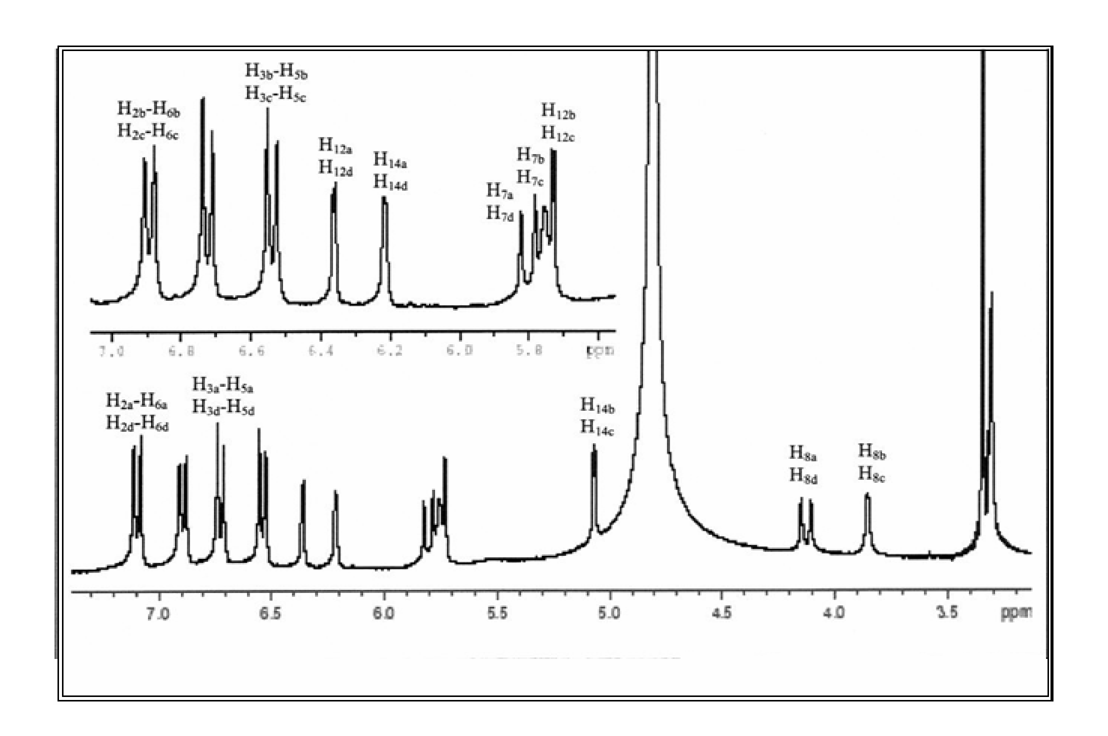


Figure 2.11 : Spectre proton de l'hopéaphénol

Tableau 2.5: Données ^1H et ^{13}C de l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol (MeOD)

	Hopéaphénol		Isohopéaphénol	
No	δ_H, *J* (Hz)	δ_C	No	δ_H, *J* (Hz)
1a		129.4	1a	
2(6)a	7.09 *d* (8.6)	130.3	2(6)a	7.52 *d* (8.6)
3(5)a	6.72 *d* (8.6)	114.2	3(5)a	6.98 *d* (8.6)
4a		158.7	4a	
7a	5.80 *d* (12.1)	88.1	7a	5.57 *d* (10.1)
8a	4.13 *d* (12.1)	49.9	8a	5.37 (10.1)
9a		141.9	9a	
10a		121.5	10a	
11a		159.3	11a	
12a	6.38 *d* (2.1)	100.3	12a	6.32 *d* (2.3)
13a		156.3	13a	
14a	6.21 *d* (2.1)	104.8	14a	6.19 *d* (2.3)
1b		136.1	1b	
2(6)b	6.89 *d* (8.6)	128.9	2(6)b	6.34 *d* (8.7)
3(5)b	6.54 *d* (8.6)	113.9	3(5)b	6.30 *d* (8.7)
4b		156.2	4b	
7b	5.75 *br s*	40.0	7b	5.04 *br s*
8b	3.86 *br s*	48.2	8b	3.35 *br s*
9b		140.2	9b	
10b		118.6	10b	
11b		159.2	11b	
12b	5.72 *d* (2.1)	84.2	12b	5.80 *d* (2.1)
13b		156.4	13b	
14b	5.07 *d* (2.1)	110.4	14b	5.42 *d* (2.1)

Le spectre du proton (figure 3.11, tableau 3.5) nous donne les informations suivantes (la description ne concerne que la moitié de la molécule, le proton symétrique correspondant est

donné entre parenthèse).

- Quatre doublets correspondant à seize protons aromatiques couplés en ortho (J=8,6Hz). Ce sont les protons des cycles disubstitués en para (A, B),
- Quatre doublets correspondant aux huit hydrogènes aromatiques couplés en *méta* (H12a (H12d) à 6,38 ppm couplé à H14a (H14 d) à 6,21 ppm) et H12b(H12c) à 5,72 ppm couplée à H14b (H14c) à 5,07ppm,
- Les signaux à 5,72 ppm et à 4,11 ppm sont caractéristiques des protons aliphatiques appartenant à un cycle oxygéné ; il s'agit donc respectivement de H7a(H7d) et H8a(H8d),
- Et enfin les deux singulets larges à 5,75 ppm et à 3,86 ppm représentant les deux protons aliphatiques H7b(H7c) et H8b(H8c) respectivement.

Les corrélations HMBC (figure 3.11 et 3.12) ont été nécessaires pour déterminer dans un premier temps la structure de la moitié de la molécule puis pour déterminer ensuite l'enchainement des deux moitiés. Les corrélations principales qui nous ont permis de reconstituer la molécule sont les suivantes :

- Le carbone 8b à 48,2 ppm corrèle avec un proton à 3,86 ppm qui correspond à H8b mais aussi, puisque la molécule est symétrique à H8c. nous avons donc ainsi établi une première liaison entre les deux moitiés de la molécule.
- Le carbone 9b à 140,2 ppm montre une corrélation avec le proton 14 b à 5,07ppm. Celle-ci permet de distinguer sur le spectre du proton H12b de H14 b. Le carbone 9b corrèle également avec H8b et H7b.
- Le carbone 8a à 49, 9 ppm permet de distinguer les protons 12 a et 14a puisque le carbone 8a ne corrèle qu'avec H14 a qui se trouve donc à 6,21ppm.

La structure de l'hopeaphénol (figure 3.10, 14) ainsi déterminée a été vérifiée en comparant les données spectrales avec ceux publiées (Takaya 2002, Ito 1997).

Concernant l'activité biologique de l'hopéaphénol, le screening d'une série de stilbènes contre diverses lignées cellulaire a montré que l'hopéaphénol possède une cytotoxicité potentielle contre un ensemble de lignées cellulaire de tumeurs humaines (carcinome épidermoïde nasopharyngé) (Masayoshi, 1999; Zgoda-Pols, 2002 ; Sahidin, 2005) et contre les cellules KB avec un ED_{50} de 1.2µg/ml (Masayoshi, 1999). L'hopéaphénol a aussi été reporté avoir des activités antibactérienne (Zgoda-Pols, 2002), anti-inflammatoire (Huang,2001), antifongique et inhibitrice d'HIV (Dai, 1998).

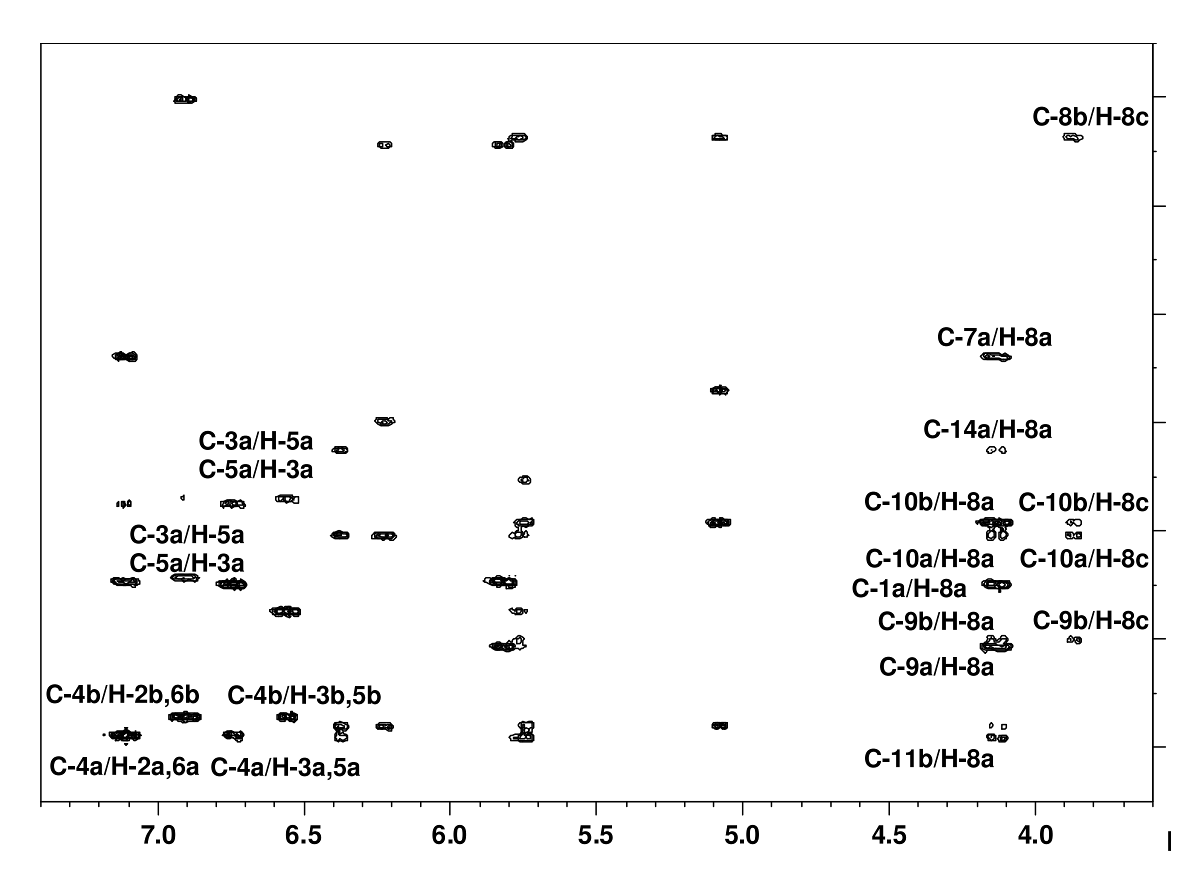


Figure 3.12 : Carte HMBC de l'hopéaphénol

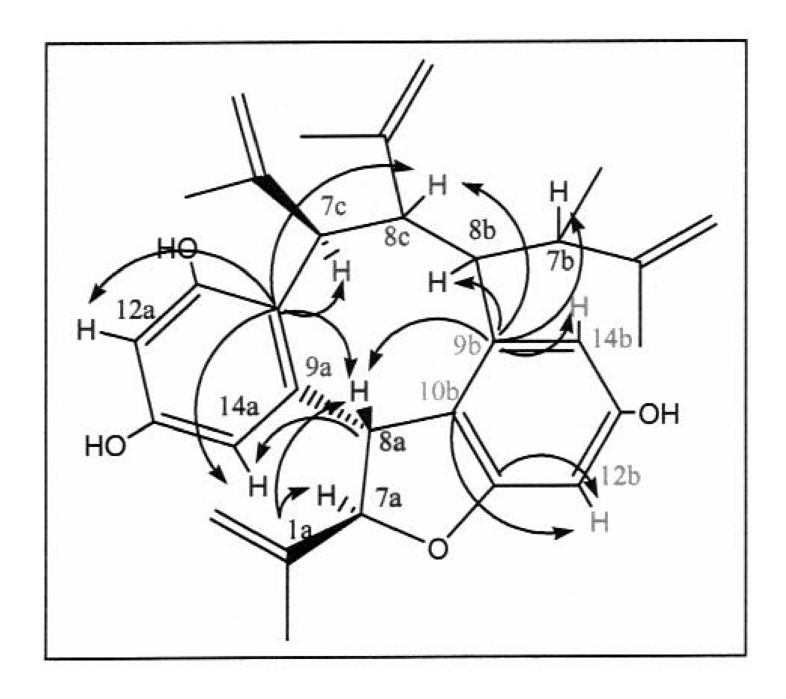


Figure 3.13 : Différentes corrélations visibles sur le spectre HMBC

- ***(-)-isohopeaphenol***

Nous représentons sur la figure (3.14) ci-dessous les corrélations HMBC de l'isohopéaphénol.

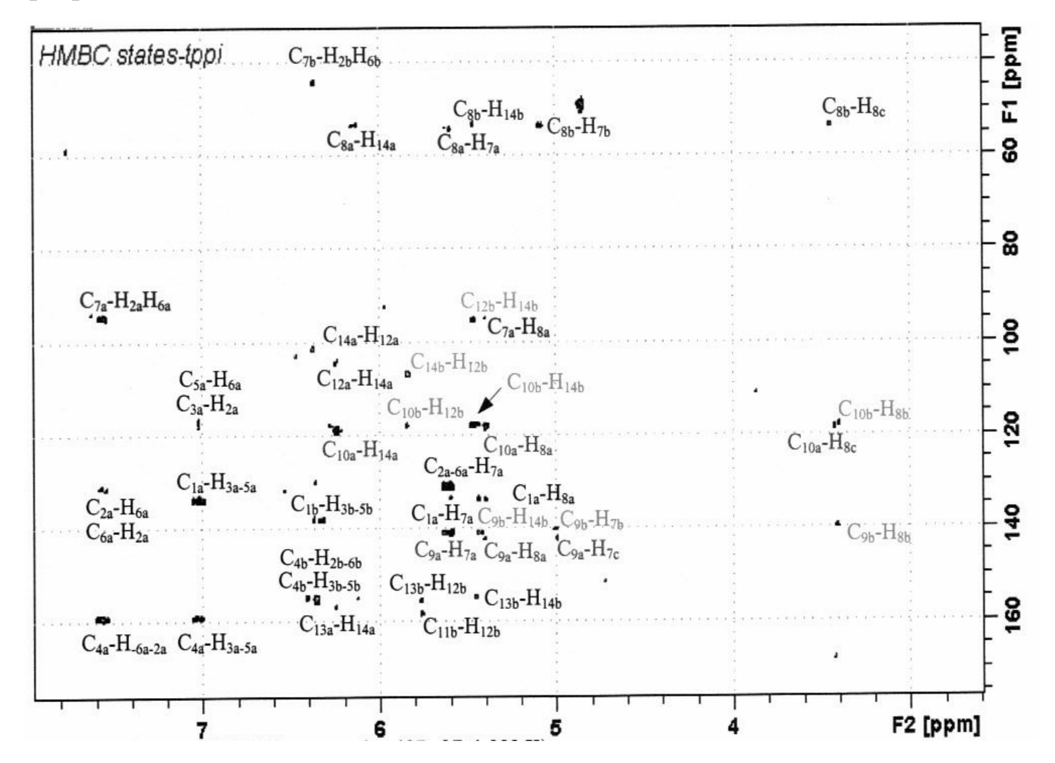


Figure 32.14: HMBC de l'isohopéaphénol

La figure (3. 15) montre les corrélations HMBC visibles sur le spectre.

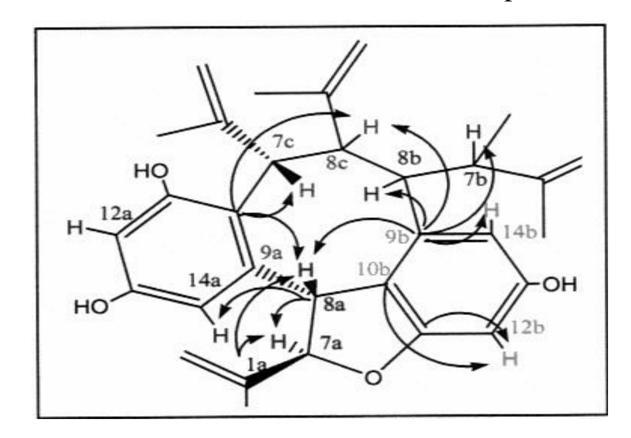


Figure 2.15: Corrélations visibles sur le spectre HMBC

Le spectre du proton montre que cette molécule est symétrique et un stéréo-isomère de l'hopéaphénol,

- Deux doublets correspondant à huit protons aromatiques couplés en ortho (J=8,6Hz). Ce sont les protons des cycles disubstitués en para (A et D),
- Un signal à 6,2 et 6,4 ppm intégrant pour 10 protons. Ce massif comprend un doublet à 6,33 ppm ainsi que deux singulets larges à 6,32 ppm et à 6,19 ppm. Il s'agit respectivement des protons couplés en *méta* H12a (H12d) et H14a(H14d). Les deux singulets larges correspondant aux huit protons aromatiques des cycles parasubstitués B et C.
- Deux doublets correspondant à quatre protons aromatiques couplés en *méta* H12b (H12c) à 5,8 ppm couplés à H14b (H14c) à 5,42 ppm
- Les signaux à 5,57 ppm et à 5,37 ppm correspondent aux protons aliphatiques appartenant au cycle oxygéné ; il s'agit donc respectivement de H7a(H7d) et H8a(H8d),
- Et enfin un singulet large à 5,04 ppm représentant le proton aliphatique H7b(H7c).

L'analyse des différents spectres nous montre une tâche de corrélation entre le proton à 5,04 ppm (H7b) et un proton situé sous le signal du méthanol à 3,35 ppm correspondant ainsi au proton H8b(H8c).

Ces données spectrales en parfait accord avec la littérature (Takaya, 2002 ; Ito ,1997) ont permis de confirmer la structure de cette molécule comme étant l'isohopéaphénol (figure 3.16, 15)

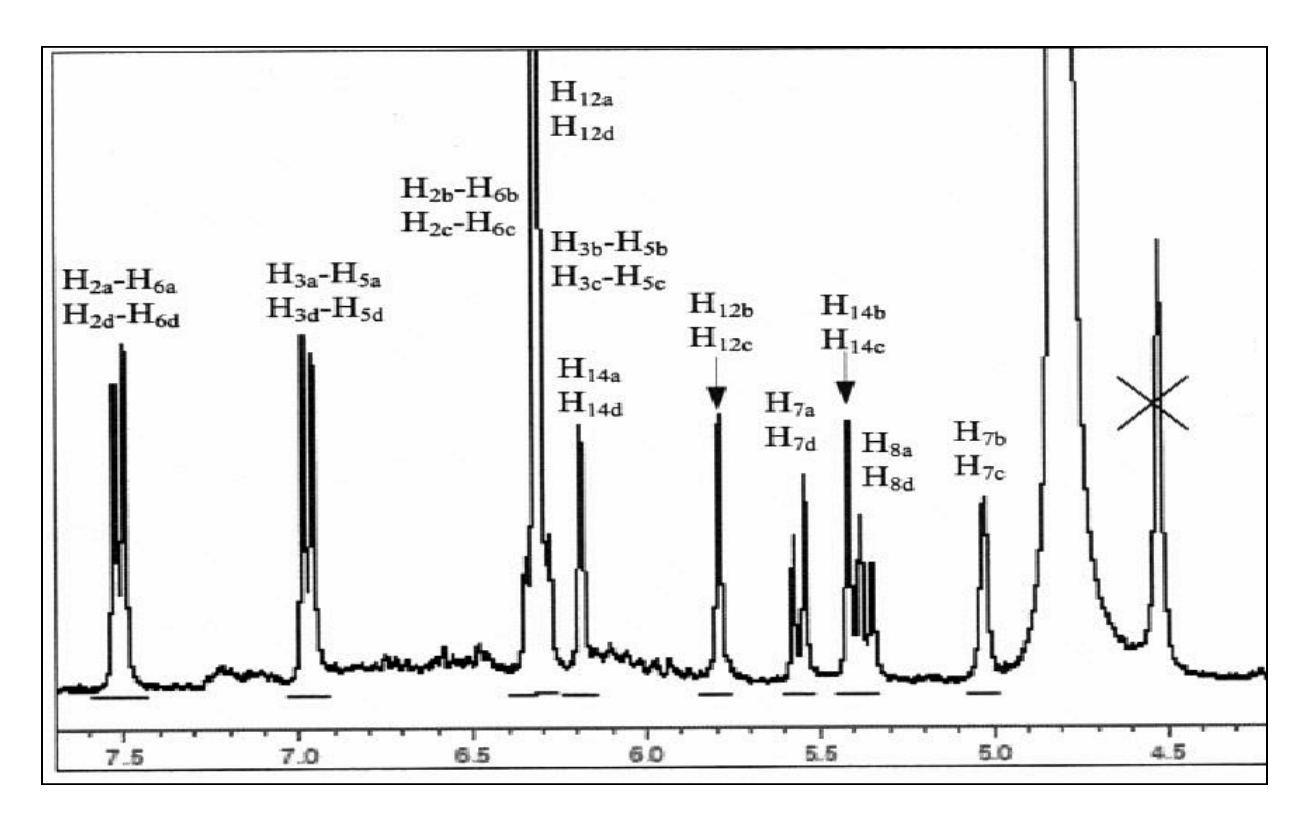


Figure 2.16: **Spectre** Proton de l'isohopéaphénol, attribution des protons

- ***Nepalensinol B (HA 77)***

Formule brute : $C_{56}H_{42}O_{12}$

Masse: 906 g/mol

Pouvoir rotatoire: $[\alpha]_D$ = -55° (C , MeOH)

16

Figure 2.17: **Nepalensinol B, tétramère du resvératrol**

Tableau 2.6 : Données RMN du nepalensinol B (HA77), **acétone-d_6**

N°	δ_H, J (Hz)	δ_C	COSY	NOE	HSQC	HMBC
1a	-	134.6	-	-	-	3(5)a, 8a
2a,6a	7.11, 2H, d *8.6*	127.0	3(5)a	7a, 8a	127.0	7a
3a,5a	6.75, 2H, d *8.6*	115.8	2(6)a	-	115.8	-
4a	-	157.8	-	-	-	2(6)a, 3(5)a
7a	5.30, 1H, d *1.7*	93.6	8a	8a, 12a, 10(14)a, 2(6)a	93.6	2(6)a
8a	4.31, 1H, d *1.7*	56.8	7a	12a, 10(14)a, 2(6)a	56.8	-
9a	-	148.4	-	-	-	7a, 8a
10a,14a	6.28, 2H, brs	106.3	12a	7a, 8a	106.3	8a, 12a
11a,13a	-	160.0	-	-	-	12a, 10(14)a
12a	6.31, 1H, t *2.2*	101.9	10(14)a	7a, 8a	101.9	10(14)a
1b	-	138.4	-	-	-	3(5)b, 7b, 8b
2b,6b	6.74, 2H, d *8.6*	128.0	3(5)b	7b, 8b	128.0	7b
3b,5b	6.56, 2H, d *8.6*	115.2	2(6)b	-	115.2	-
4b	-	155.7	-	-	-	2(6)b, 3(5)a
7b	4.29, 1H, brs	50.0	8b	2(6)b	50.0	8b, 2(6)b
8b	3.96, 1H, brs	60.3	7b	2(6)b	60.3	7b
9b	-	144.5	-	-	-	7b, 8b
10b	-	116.1	-	-	-	7a, 8a, 12b
11b	-	163.1	-	-	-	7a, 8a, 12b
12b	6.20, s	96.5	-	-	96.5	-
13b	-	155.4	-	-	-	12b
14b	-	126.4	-	-	126.4	7b, 8b, 12b

Dans le tableau (3.6), ci-dessus nous représentons les données RMN complètes du nepalensinol B (figure 3.18). Les oligomères du resvératrol, nepalensinol A, B et C, ont été isolés des sarments de *Kobresia nepalensis* (Cyperaceae) (Yamada, 2006) mais sont encore inconnus chez les Vitaceaes, donc cela représente la première fois que l'on reporte le nepalensinol B chez *vitis vinifera*. Les nepalensinols A, B et C ont montré un effet inhibiteur sur la topoisomérase II plus puissant que l'étoposide (VP-16) (un inhibiteur de la topoisomérase II utilisé comme médicament anticancéreux). Le nepalensinol B, en particulier, a montré l'activité la plus efficace avec un IC_{50} de 0.02 µmol (Yamada, 2006).

- **Viniferol E**

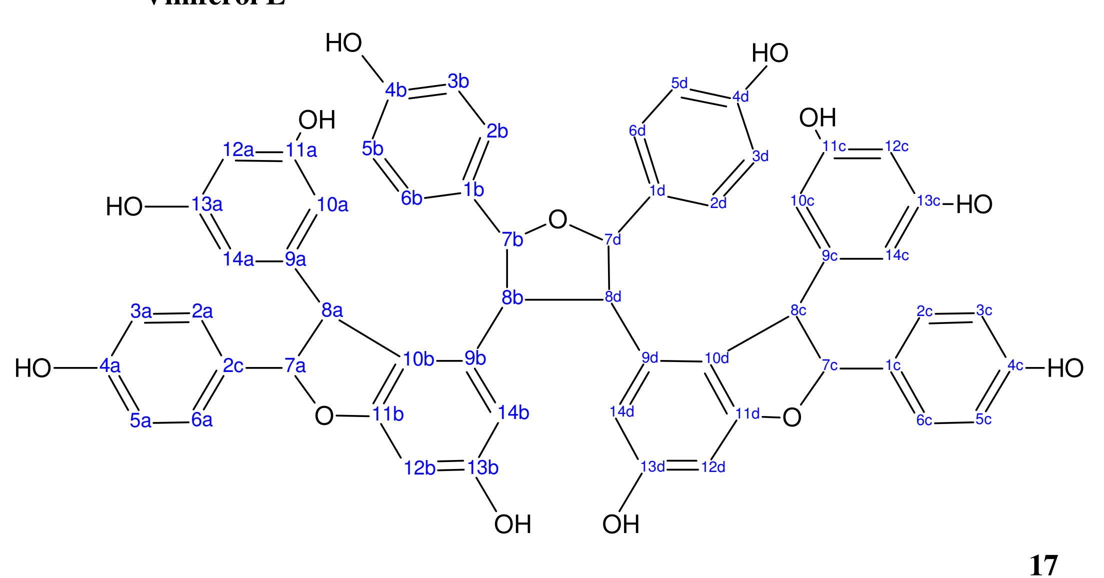


Figure 3 .18: Structure du viniferol E

Tableau 3.7: Données RMN du viniferol E, acétone-d_6

N°	δH, J (Hz)	δC	HMBC (C→H)	NOE
1a	-	133.5	3(5)a, 7a, 8a	-
2a,6a	6.69, d 8.6	128.4	7a	7a, 8a
3a,5[a]	6.54, d 8.6	115.6	-	7a, 8a
4[a]	8.2	158.0	2(6)a	3(5)a
7[a]	5.08, d 4.8	94.7	8a, 2(6)a	2(6)a, 3(5)a, 10(14)a, 12d, 14d
8a	3.950, d 4.8	55.0	7a, 10(14)a	2(6)a, 3(5)a, 10(14)a, 12a, 14d
9a	-	148.1	7a, 8a	-
10a,14a	6.03, brs	107.0	8a, 12a	7a, 8a
11a,13a	8.07	160.1	12a	12a
12a	6.29, t 2.2	101.8	10(14)a	8a
1b	-	130.2	3(5)b, 7b, 8b	-
2b,6b	6.76, d 8.6	129.3	7b	7b, 8b
3b,5b	6.58, d 8.6	115.6	-	7b, 8b
4b	8.2	157.6	2(6)b	3(5)b
7b	5.00, d 10.4	85.0	8b, 2(6)b	2(6)b, 3(5)b, 14b, 8c, 10(14)c, 14d
8b	3.60, dd 10.4, 12.0	52.9	7b, 14b, 7d, 8d	2(6)b, 3(5)b, 14b, 10(14)c, 8c, 14d
9b	-	138.7	8a, 7b, 8b, 8d	-
10b	-	122.8	7a, 8a, 8b, 12b, 14b	-
11b	-	161.8	7a, 8a, 12b	-
12b	6.16, d 2.1	95.9	14b	-
13b	8.40	160.1	12b, 14b	14b
14b	6.67, d 2.1	105.3	8b, 12b	7b, 8b
1c	-	133.5	3(5)c, 7c, 8c	-
2c,6c	6.88, d 8.6	128.9	7c	7c, 8c
3c,5c	6.68, d 8.6	115.6	-	7c, 8c
4c	8.35	158.4	2(6)c	3(5)c
7c	5.23, d 5.0	93.4	8c, 2(6)c	2(6)c, 3(5)c, 10(14)c, 12c, 12d
8c	4.09, d 5.0	55.7	7c, 10(14)c	2(6)c, 3(5)c, 10(14)c, 12c, 7b, 8b, 7d, 8d
9c	-	148.4	7c, 8c	-
10c,14c	6.25, d 2.2	107.0	8c, 12c	7c, 8c, 7b, 8b, 7d, 8d
11c,13c	8.35, brs	160.1	12c, 10(14)c	10(14)c, 12c
12c	6.32, t 2.2	101.8	10(14)c	7c, 8c, 7d
1d	-	133.6	3(5)d, 7d, 8d	-
2d,6d	6.79, d 8.6	129.3	7d	7d, 8d
3d,5d	6.64, d 8.6	115.1	-	7d, 8d
4d	8.03	156.7	2(6)d	3(5)d
7d	4.70, d 9.4	82.0	8d, 2(6)d	2(6)d, 3(5)d, 8c, 10(14)c, 14d
8d	3.955, dd 9.4, 12.0	58.6	7b, 8b, 7d, 14d	2(6)d, 3(5)d, 8c, 10(14)c, 12d, 14d
9d	-	136.3	8b, 8c, 7d, 8d	-
10d	-	123.3	7c, 8c, 8d, 12d, 14d	-
11d	-	160.3	7c, 8c, 12d	-
12d	5.92, d 2.1	96.4	14d	8d, 7a, 7c
13d	7.75, brs	158.2	12d, 14d	12d, 14d
14d	5.68, d 2.1	110.2	8d, 12d	7d, 8d, 7a, 8a, 7b, 8b

La structure de ce composé (figure 3. 19) a été déterminée par analyse des données RMN (tableau 3.11) qui ont été comparées à celles publiées par Fujii et al (Fujii, 2005).

❖ ***Dihydroflavanols***

18

19

Figure 2.19 : Dihydroflavanols isolés à partir du mode descandant : 18 : Astilbin, 19 : Engeletin

Tableau 3.8: données ^{1}H et ^{13}C de l'engeletin (acétone-d_6) et de l'astilbin (DMSO d-6)

Engeletin			Astilbin	
No	**δH, J (Hz)**	**δC**	**No**	**δH, J (Hz)**
2a	**5.25 d (11.1)**	**82.4**	**2a**	**5.23 (d, 9.8 Hz,)**
3a	**4.76 d (11.1)**	**76.6**	**3a**	**4,63 (d, 9.8Hz),**
4a		**195.4**		
5a		**164.5**	**5a**	**11,8 (OH),**
6a	**5.99 d (2.1)**	**96.1**	**6a**	**5.87 (d, 2.0 Hz),**
7a		**166.3**		
8a	**5.96 d (2.1)**	**95.0**	**8a**	**5.89 (d, 2.0 Hz),**
9a		**162.8**		
10a		**101.4**		
1b		**127.3**		
2b(6b)	**7.44 d (8.6)**	**128.9**	**2b**	**6.88 (s)**
3b(5b)	**6.91 d (8.6)**	**115.3**	**5b, 6b**	**6.74 (s),**
4b		**158.0**		
1c	**4.06 br s**	**100.4**	**1c**	**4.04 (br,s)**
2c	**3.54 m**	**70.5**		
3c	**2.57 m**	**71.3**		
4c	**3.31 m**	**72.5**		
5c	**4.22 m**	**68.7**		
CH3	**1.14 d (6.2)**	**16.9**	**6c**	**d(d, 5.9 Hz) 3.09-3.91(m,H,sucre)**

- ***Astilbin (dihydroquercetin 3- α -L-rhamnopyranoside)***

Formule brute : $C_{21}H_{22}O_{11}$

Masse : 450 g/mol

Le spectre ^{1}H RMN (tableau 3.12) montre un signal correspondant à un rhamnose avec un

déplacement typique δ1.18 ppm (J 6.2 Hz). Le large singulet à 4.04 ppm (J 1.5 Hz) indique une configuration R du proton anomérique du sucre (H-1″). L'identification de la structure de l'astilbin (figure 3.25, 18) (dihydroquercetin 3-*O*-α-rhamnoside) a été confirmée par les données de FAB+MS (m/z 451) et par comparaison des données RMN avec la littérature (Lu, 1999). Des activités biologiques diverses ont été cernées pour l'astilbin: elle diminue la concentration totale du cholestérol dans le foie, chez les rats (Igarashi, 1996, Closa 1997) et protège les cellules des globules rouges contre le stress oxydatif *in vitro* (Haraguchi, **1996**).

- ***Engeletin (dihydrokaempferol 3 -α-L-rhamnopyranoside)***

Formule brute : $C_{21}H_{22}O_{10}$

Masse : 434 g/mol

L'engeletin (3.19, 19) et l'astilbin, ont été isolés à partir de feuilles du *Cauliflorus R. de Stelechocarpus*. (Annonaceae). L'activité inhibitrice de l'engeletin contre l'aldose réductase humaine (IC_{50} de 1.16µM) était deux fois plus importante que celle de la quercétine (témoin) (2.48µM) et 23 fois plus importante que l'astilbin (26.7µM). Ces flavonoïdes ont montré un effet thérapeutique important dans la prévention et le traitement des complications diabétiques (Wirasathien, 2006)

3.2. POLYPHÉNOLS EXTRAITS DU VIN MERLOT

L'extrait polyphénolique du vin de la variété Merlot a été soumis au fractionnement par CPC (chapitre 2) les fractions ont été par la suite repurifiées par HPLC semi-préparative, les composés isolés sont les suivants :

De la fraction β on a extrait la *trans*-ε-viniférine. L'hopéaphénol et le pallidol ont été isolés à partir de la fraction δ. L'astilbin est le constituant majoritaire de la fraction B. Le picéide a été isolé de la fraction C (système 1). La structure de ces composés a été élucidée en comparant leur RMN du proton 1H et leur corrélations 2D avec celles que nous avons obtenues pour les sarments. Ces composés ont par la suite été utilisés comme standards et ont été dosés dans 10 échantillons de vins de l'Afrique du nord.

Remarque: Dans tout ce qui suit, quand il est question de la viniférine, il s'agira de l'isomère (+) trans ε-viniférine.

3.2.1. Données chromatographiques des standards :

Les figures (3.26) à (3.35) représentent les spectres UV et les courbes étalons des différents composés à doser et les tableaux (3.13) à (3.18) montent les données pour construire les courbes d'étalonnage.

- **Courbes étalons, temps de rétention et maximum d'absorption :**
  - ***Trans-resveratrol***

Le spectre UV du resvératrol est le même que celui du picéide (Figure 3.28)

Tableau 2.9: Données HPLC analytique pour le trans-resveratrol

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Écart type	µg injectés
	1	2	3			
2,5	270,8	271	270,9	270,9	0,1	0,125
5	539	541	540	540,0	1,0	0,25
10	1070	1071	1070,5	1070,5	0,4	0,5
15	1590	1591	1590	1590,3	0,6	0,75
20	2137	2138	2139	2138,0	1,0	1

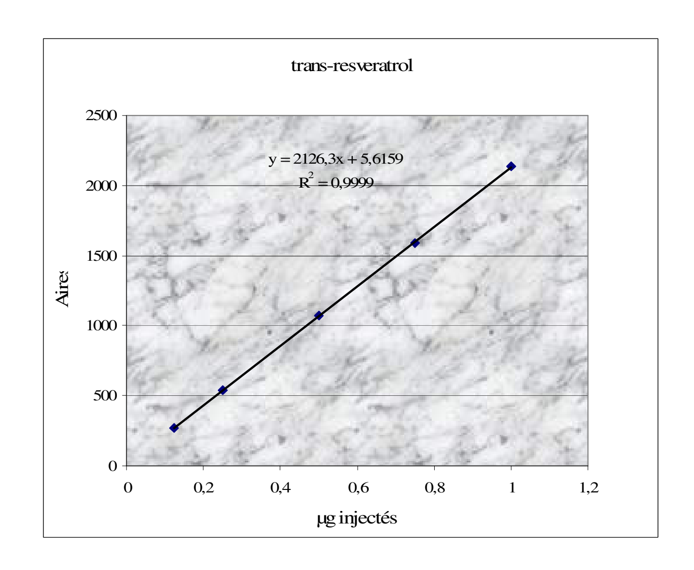


Figure 2.20: Courbe étalon du resvératrol

- ***Trans picéide***

Tableau 3.10: Données HPLC analytique pour le *Trans* picéide

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Ecart type	µg injectés
	1	2	3			
2,5	127	128	129,1	128,0	1,1	0,125
5	256,4	256,9	257	256,8	0,3	0,25
10	520	521	522	521,0	0,8	0,5
15	770	771	772	771,0	1,0	0,75
20	1040	1041	1042	1041,0	1,0	1

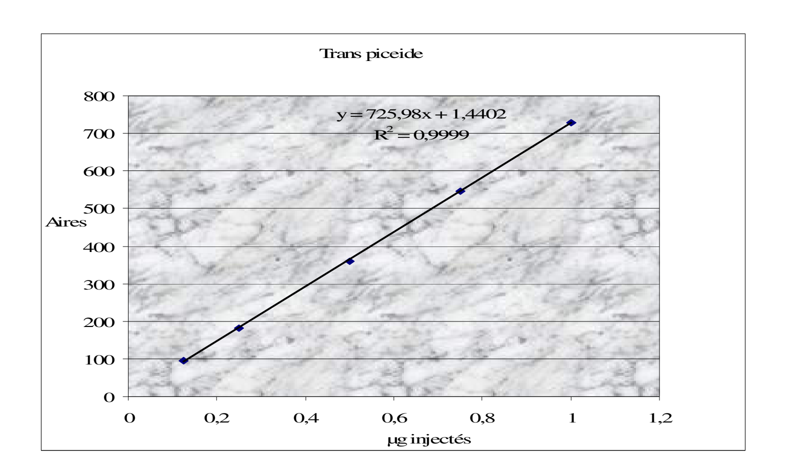


Figure 3.2.4 : Courbe étalon du picéide

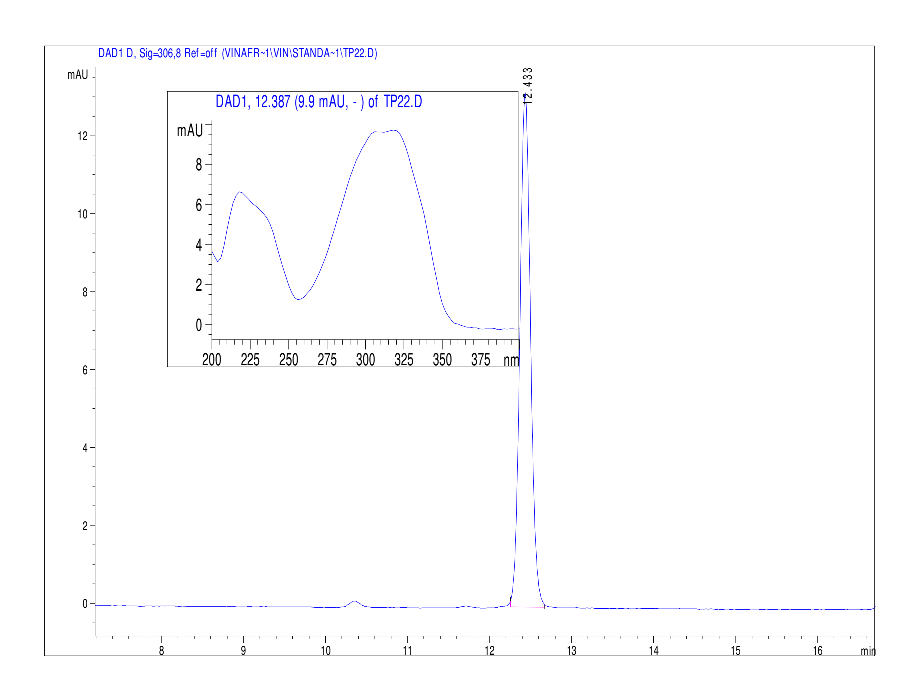


Figure 3.22: Temps de rétention et profil UV du piceid,
Tr= 12.133 mn, λ_{max} = (225nm, 310nm)

- ***Trans-ε Viniférine***

Tableau 3.11: Données HPLC analytique pour la trans ε-viniférine

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Ecart type	µg injectés
	1	2	3			
2,5	127	128	129,1	128,0	1,1	0,125
5	256,4	256,9	257	256,8	0,3	0,25
10	520	521	522	521,0	0,8	0,5
15	770	771	772	771,0	1,0	0,75
20	1040	1041	1042	1041,0	1,0	1

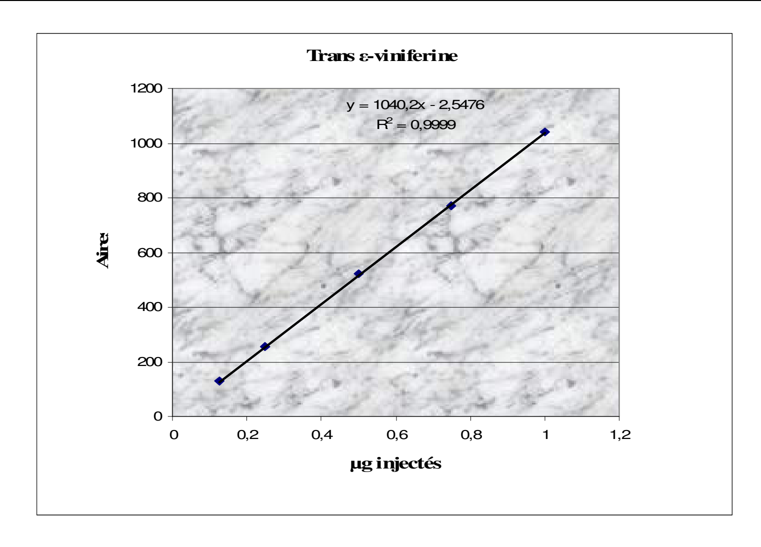


Figure 3.23: Courbe étalon de l'ε-viniférine

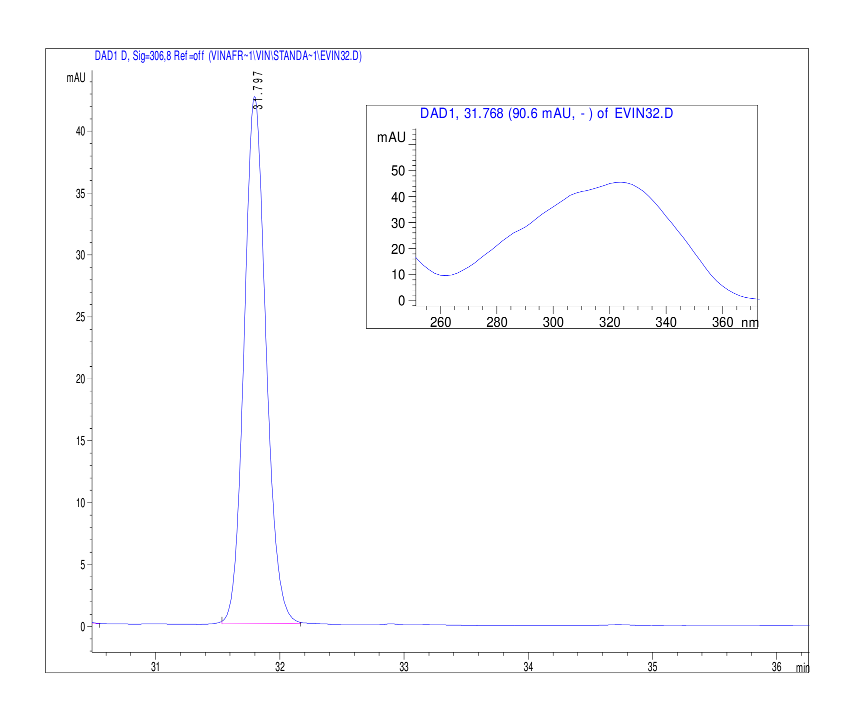


Figure 3.24: Temps de rétention et profil UV de la trans ε-viniférine
Tr= 31.191 mn, λ_{max} =330

- ***Pallidol***

Tableau 3.12 : Données HPLC analytique pour le pallidol

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Ecart type	µg injectés
	1	2	3			
2,5	71,2	71,3	71,1	71,2	0,1	0,125
5	142,2	142,1	142,3	142,2	0,1	0,25
10	283,6	283,5	283,4	283,5	0,1	0,5
15	426,6	426,5	426,4	426,5	0,1	0,75
20	566,1	566,2	566,3	566,2	0,1	1

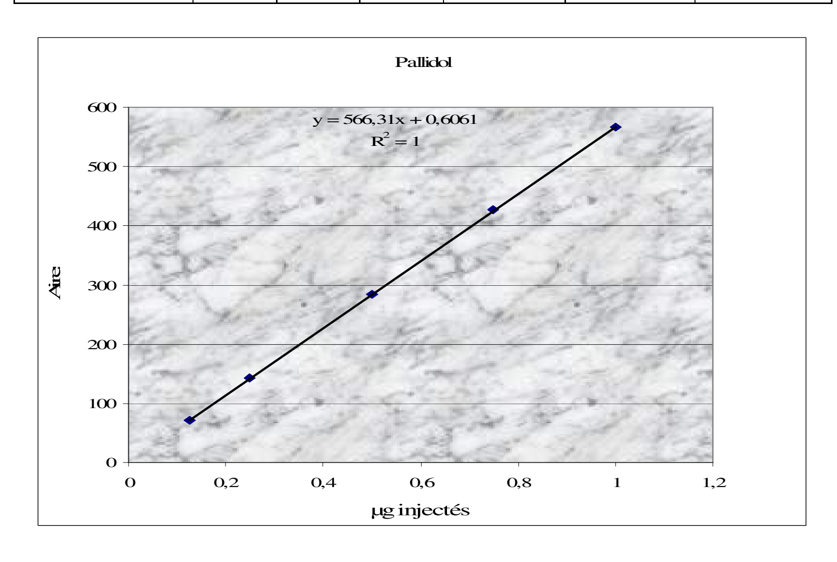


Figure 3.25: Courbe étalon du pallidol

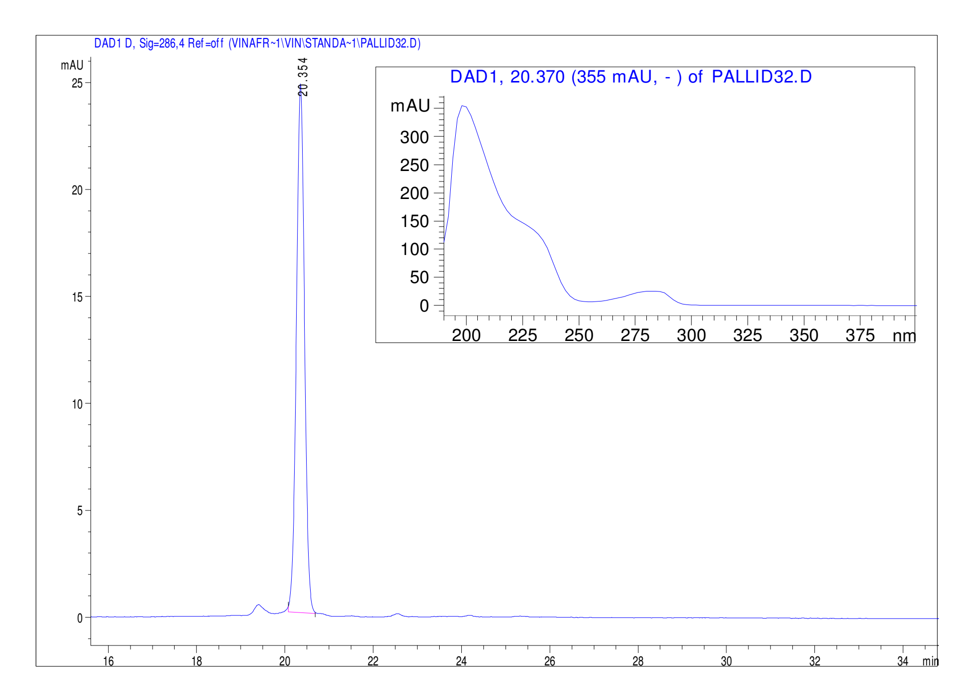


Figure 3.26 : Temps de rétention et profil UV du pallidol, Tr= 20 .351 mn, λ_{max} = 210nm, 286nm

- ***Hopéaphénol***

Tableau 3.13: Données HPLC analytique de l'hopéaphénol

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Ecart type	µg injectés
	1	2	3			
2.5	102	102,2	102,1	102,1	0,1	0,125
5	204	204,4	204,2	204,2	0,2	0,25
10	408	408,8	408,4	408,4	0,3	0,5
15	608	608,4	608,5	608,3	0,3	0,75
20	812,1	812,2	812	812,1	0,1	1

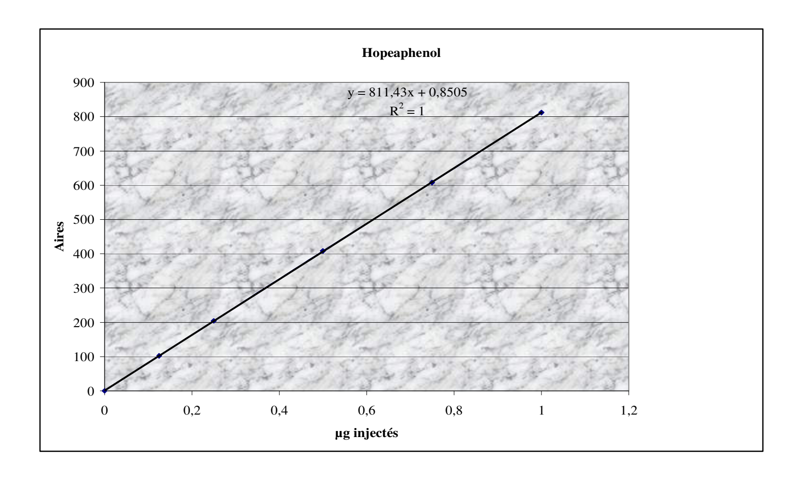


Figure 3.27: Courbe étalon de l'hopéaphénol

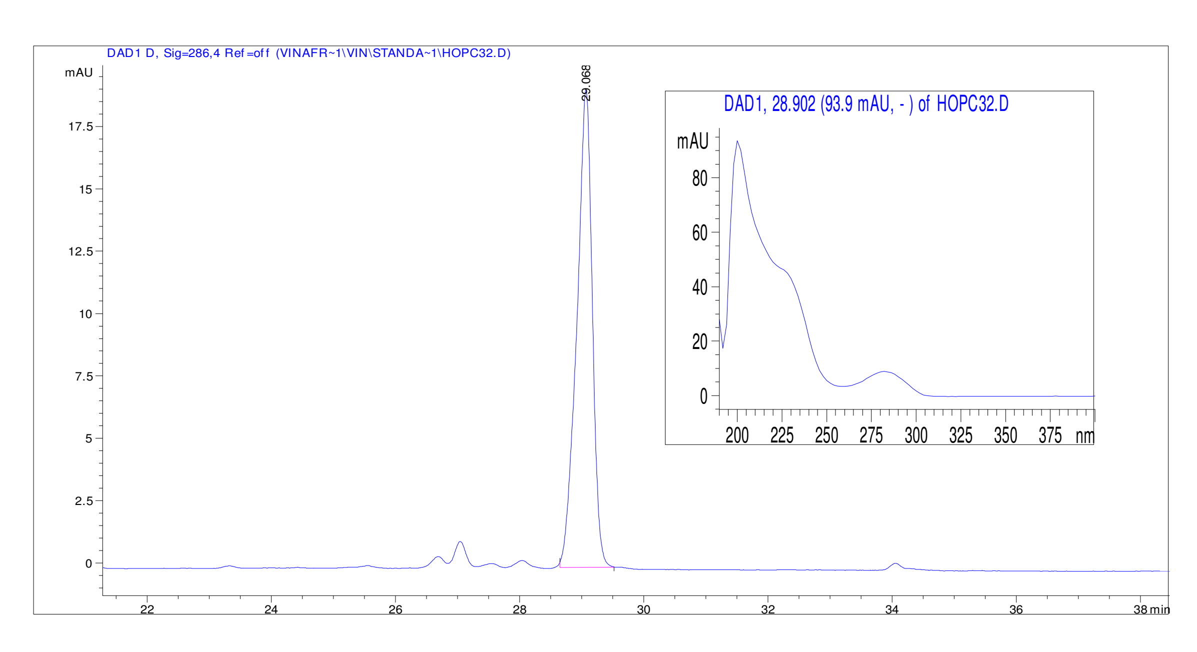


Figure 3.28: Temps de rétention et profil UV de l'hopéaphénol
Tr= 29.068 mn, λ_{max} = 286nm

- ***Astilbin***

Tableau 3.14: Données HPLC analytique de l'astilbin

Concentrations µg/ml	Aires			Moyenne	Ecart type	µg injectés
	1	2	3			
2,5	127	128	129,1	128,0	1,1	0,125
5	256,4	256,9	257	256,8	0,3	0,25
10	520	521	522	521,0	0,8	0,5
15	770	771	772	771,0	1,0	0,75
20	1040	1041	1042	1041,0	1,0	1

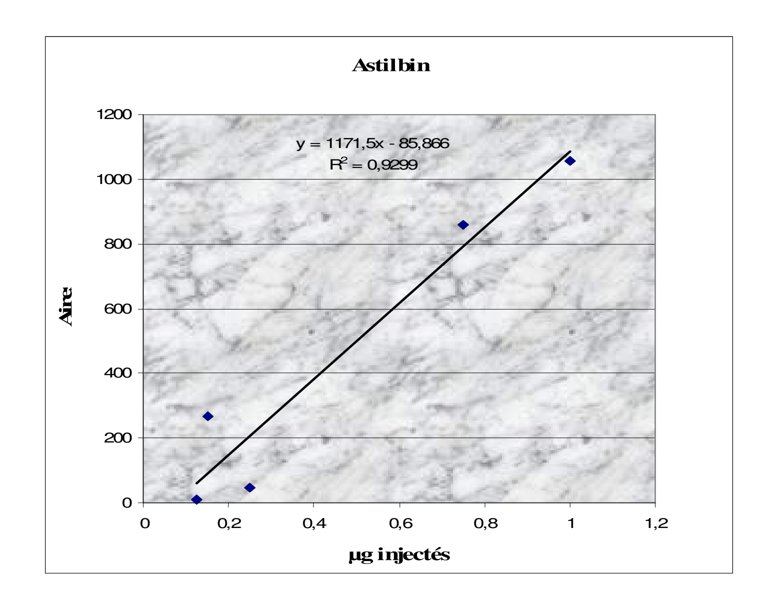


Figure 3.29: Courbe étalon de l'astilbin

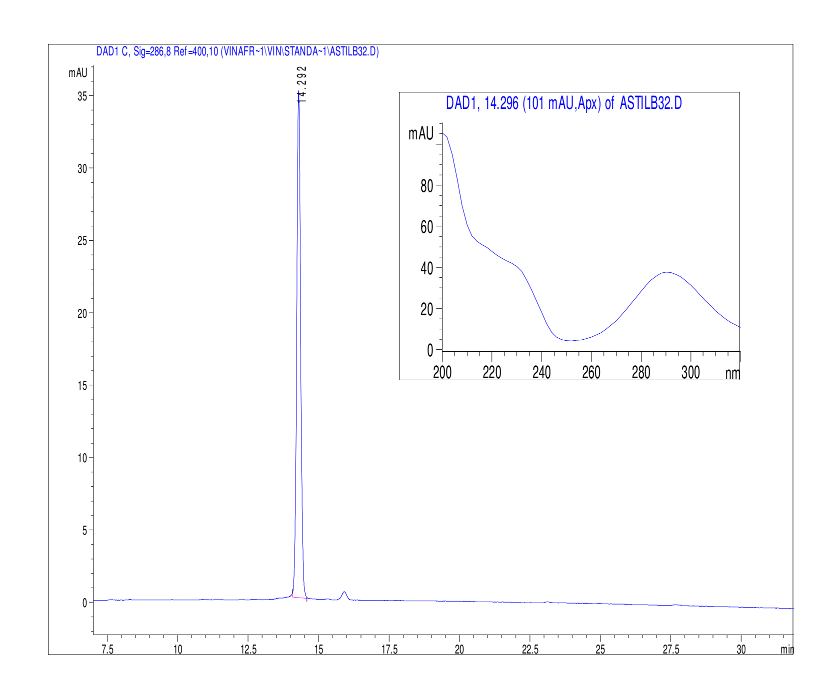


Figure3.30: Temps de rétention et profil UV de l'astilbin
Tr= 14.292 mn, λ_{max} =296 nm

3.3. CONCENTRATIONS DES POLYPHÉNOLS DANS LE VIN.

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, les courbes d'étalonnage étaient linéaires et un facteur de régression, (r^2>0,95) a été obtenu pour toutes les solutions des composés standards. La quantification des polyphenols a été achevée par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diode. La ligne de base pour tous les échantillons était linéaire et la séparation et la résolution des pics qui nous intéressaient étaient bonnes. Nous représentons dans la figure (3.34) le chromatogramme HPLC de la variété Merlot alors que ceux des autres variétés seront présentés en annexe (C).

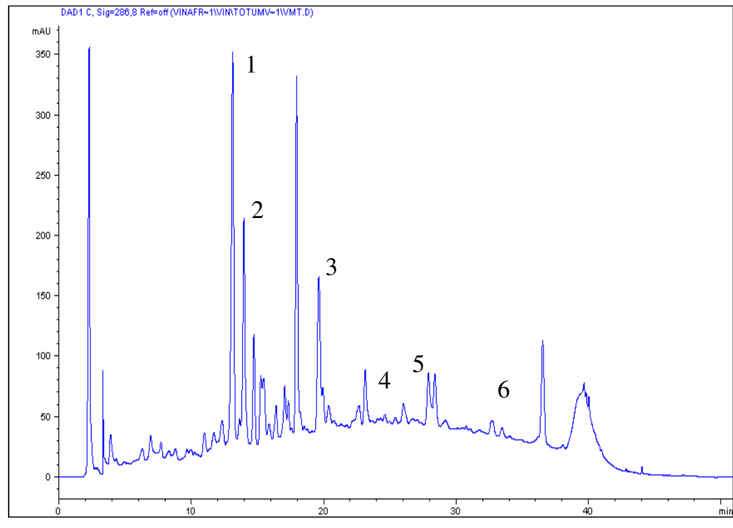


Figure 3.31 : **Chromatogramme HPLC du Merlot (après Dowex) ; 1 : *trans* picéide, 2 : astilbin,3 : Pallidol, 4 : *trans* resvératrol, 5 : hopéaphénol, 6 : *trans* ε-viniférine**

Tableau 3.15: Concentrations des polyphénols dans 10 variétés de vins de l'Afrique du Nord

Variété	***Trans* resvératrol**	***Trans* ε-viniférine**	***Trans*-picéide**	**Hopéa-phénol**	**Astilbin**	**Pallidol**	**Stilbenes Totaux [b]**
Merlot	**3.4**	**1.2**	**14**	**2.1**	**10.8**	**4.1**	**27.20**
Cabernet Sauvignon	**2.2**	**0.69**	**9.37**	**1.48**	**11.8**	**3.54**	**17.63**
Sidi-Brahim	**3.45**	**ND[a]**	**17.6**	**0.61**	**ND**	**5.34**	**27.00**
Cuvée du président	**3.2**	**ND**	**45**	**ND**	**10.82**	**0.2**	**48.62**
Gris d'Algérie	**0.77**	**ND**	**31.3**	**0.3**	**ND**	**ND**	**32.47**
Muscat	**0.72**	**ND**	**4.6**	**3.06**	**11.4**	**9 .2**	**17.96**
Ksar	**0.66**	**0.49**	**8.5**	**3.8**	**21.4**	**3.4**	**17.23**
Amjad	**2.5**	**0.2**	**38.6**	**0.34**	**10.82**	**0.35**	**42.19**
Guerouane	**ND**	**ND**	**15**	**2.68**	**24.22**	**4.63**	**21.48**
Terrad	**ND**	**ND**	**10**	**ND**	**ND**	**7**	**17.13**

[a]ND : Non Détecté, [b] Somme des concentrations en stilbènes de chaque composé.

Les concentrations des composés dans les divers échantillons de vins étudiés (tableau 3.19) sont calculées à partir des aires des pics des chromatogrammes de l'HPLC analytique**.**

Comme il est montré dans le tableau (3.15), On peut remarquer que certains composés ne sont pas présents dans certains types de vins. L'hopeaphénol est présent dans 8 variétés de vins analysés à des concentrations importantes et absent chez 'cuvée du président et 'Terale'. La variété 'Ksar', un vin rouge Marocain, contient la quantité la plus importante d'hopéaphénol (3.8mg/L), suivie du Muscat (3.06mg/L), Guerouane (2.68 mg/L), Merlot (2.1mg/L), Cabernet Sauvignon (1.48mg/L), Sidi-Brahim (0.61mg/L), Amjad (0.34mg/L) et Gris d'Algérie (0.3mg/L).

La concentration moyenne du *trans* resveratrol était de 2.11mg/L, cette valeur est similaire à celle reportée pour les vins rouges français (Landrault, 2002) mais supérieure à la valeur reportée pour les vins grecs (0.895 mg/L) (Soleas**,** 1997). Toutefois, pour le *trans* resvératrol des valeurs encore plus importantes (5.13, 3.99 et 2.43 mg/L) ont été enregistrées pour des vins espagnols faits à partir de Pinot noir et de Merlot (Lamuela-Raventos, 1995).

La concentration moyenne en picéide était de 19.4 mg/L, avec une valeur maximale pour le vin "Cuvée du Président" de 45 mg/L, cette valeur est cinq fois supérieure à celle trouvée pour le Cabernet-Sauvignon. La valeur minimale étant de 4.6 mg/L (Terrale).

Les concentrations en pallidol s'étendent de 0.2 mg/L (Cuvée du président) à 9.2 mg/L (Muscat), cette dernière étant trois fois plus importante que celle trouvée pour le Cabernet-Sauvignon. La valeur mentionnée dans la littérature pour les vins rouges était de 3.45 g/L

(Vitrac, 2002) alors que la valeur reportée pour les vins Riesling était de 0.05 mg/L (Baderschneider, 2000).

trans ε-viniférine était présente seulement dans quatre variétés de vins rouges (Merlot, Cabernet-sauvignon, Ksar et Amjad), sa concentration s'étalait de 0.2 à 1.2 (mg/L). Il a été montré que les viniférines et certains autres dimères de resveratrol sont des métabolites fongiques du resveratrol (Pezet, **2003**). Ainsi, l'occurrence de ce composé dans le vin est probablement due à l'oxydation du resveratrol par les champignons dans des baies infectées utilisées pour la vinification.

Concernant l'astilbin, la valeur maximale détectée était de 24.2 mg/L, avec une moyenne de 9.17 mg/L, alors que la valeur reportée dans la littérature jusqu'à maintenant est de 15 mg/L (Landrault, 2002). L'astilbin a été précédemment trouvée dans la pellicule du raisin blanc, dans le vin blanc et dans les rafles.

Jusqu'à nos jours, les vins blancs ont été considérés comme pauvres en composés phénoliques (Soleas, 1997 ; Quineya,2004) par rapport aux vins rouges car, ces derniers sont enrichis en composés phénoliques par une technique de vinification consistant à laisser macérer les baies avec les pépins, moût et pellicules. Imprévisiblement, dans l'échantillon de vin blanc (Muscat) étudié les concentrations des composés phénoliques recherchés étaient très importantes et valaient en mg/L, 0.72 (*trans*-resveratrol), 4.6 (*trans*-picéide), 11.4 (astilbin), 3.06 (hopéaphénol) (concentration presque égale à celle détectée pour le merlot), et la concentration maximale en pallidol 9.2mg/L.

Ces résultats aussi surprenants soient ils sont intéressantes car jusqu'à présent, le *trans*-resveratrol est le seul stilbène trouvé et dosé dans les vins blancs.

Dans la figure (3.38), nous montrons les moyennes de concentration en hopéaphénol, tétramère de resvératrol dans dix variétés de vins du Maghreb, accompagnée de la valeur des stilbènes totaux exprimée comme étant la somme des concentrations de chaque stilbène pour chaque variété de vin.

Cette figure montre que la concentration la plus élevée en polyphénols (mg/L) est trouvée dans la variété Cuvée du président, vin rouge Algérien de renommée (48.62), et la plus faible dans la variété Terrale (17.13), vin rouge Tunisien.

Dans cette partie nous allons présenter les différents tests biologiques réalisés en utilisant certains composés que nous avons isolés et que nous avons présentés dans la partie précédente.

Les tests effectués sont des tests anti-inflammatoires (immuno-enzymatique et production du NO) ainsi que le test de viabilité cellulaire en utilisant des cellules cancéreuses de colon ou Caco2.

3.4. ACTIVITÉS ANTI-INFLAMMATOIRES

Les maladies inflammatoires chroniques constituent un des problèmes de santé majeur. En effet, l'inflammation est un phénomène impliqué dans le développement de nombreuses maladies telles que l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer.

Jang et al (Jang, 1997) ont montré que le resvératrol pouvait empêcher la promotion de tumeurs de la peau chez la souris par sa capacité d'inhiber l'activité enzymatique de COX-1 et COX-2. De plus, les prostaglandines ayant une action stimulante sur la croissance cellulaire, l'inhibition de leur biosynthèse empêche ainsi la prolifération de certaines lignées cancéreuses (Savouret at al, 2001). En conséquence, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules anti-inflammatoires possédant un minimum d'effets indésirables.

3.5. TESTS ANTI-INFLAMMATOIRES

3.5.1. Test immuno-enzymatique

L'objectif de cette partie est de rechercher, puis de mettre en œuvre un test biologique permettant de tester l'activité anti-inflammatoire des polyphénols isolés. Pour cela, nous devons dans un premier temps valider la technique en testant un polyphénol connu, le *trans*-resvératrol, puis nous testerons les polyphénols d'intérêt isolés à partir des sarments de vigne.

Nous avons de prime abord testé l'efficacité du test immuno-enzymatique en utilisant le *trans* resvératrol dont les valeurs de l'ic50 sur les deux COX sont connues. On définit l'IC50 comme étant la concentration de l'échantillon entraînant l'inhibition de 50% de l'activité enzymatique de la cyclooxygénase.

L'IC50 de l'Hopeaphénol étant totalement inconnue, nous avons dans un premier temps testé une gamme de concentration très large allant de 1 à 100 µg/mol. Nous avons ensuite affiné cette gamme de concentrations autour de la zone de l'IC50.

Les mêmes concentrations exprimées en µg/mol pour les deux produits ont été testées. Afin de pouvoir les comparer, les résultats de l'IC50 sont exprimés en concentration molaire, les masses moléculaires des deux composés étant en effet très différentes (228 et 906 g/mol pour le trans resvératrol et l'hopeaphénol respectivement). L'obtention des pourcentages d'inhibition est décrite figures (3.39 A et B) et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau (3.20).

L'IC50 obtenue du resvératrol est de 4 µM sur la COX -1 et de 25 µM sur la COX-2. Nos résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (waffo-Tuéguo et al, 2001 a)

Tableau 3.16: IC50 du *trans* resveratrol et de l'hopéaphénol

Composé	COX-1	COX-2
Trans resveratrol	4 µM	25 µm
Hopéaphénol	23 µM	> 100µM

L'IC50 de l'hopeaphénol est de 23 µM vis à vis de la COX-1. Par contre, une concentration de ce composé de 100 µg/mol (soit 110,4 µM) donne un pourcentage d'inhibition de 43,3% seulement envers la COX-2. Une IC50 supérieure à 100 µM n'est pas intéressante et montre que le composé d'intérêt a un faible pouvoir inhibiteur. Au vu de ces premières estimations, la détermination précise de l'ic50 de l'hopeaphénol vis-à-vis de la COX-2 n'a pas été réalisée. Ainsi, l'hopeaphénol possède un potentiel anti-inflammatoire non négligeable mais il reste toutefois cinq fois moins actif que le resvératrol. Par contre l'hopeaphénol inhibe plus efficacement l'activité de la COX-1 que d'autres stilbènes tel que le pallidol qui possède une valeur de l'IC50 de 50µm (Waffo-Tuego et al, 2001a), ce composé possède donc une activité intermédiaire.

En revanche, comme la plupart des polyphénols connus, il n'a pas montré le résultat attendu, à savoir une inhibition sélective de la COX-2.

Au vu des résultats, il semblerait que les tétramères soient moins actifs que les monomères comme le resvératrol. Varache-Lembège et al. (Varache-Lembège, 2000) ont montré que le resvératrol possède une conformation qui s'intègre bien avec le site actif de la COX ce qui expliquerait sa forte activité. Par contre, l'hopeaphénol en vu de sa structure, il présente un encombrement stérique important pour se lier au site actif de la COX. Quoique les mécanismes de liaison à la COX méritent d'être plus approfondis.

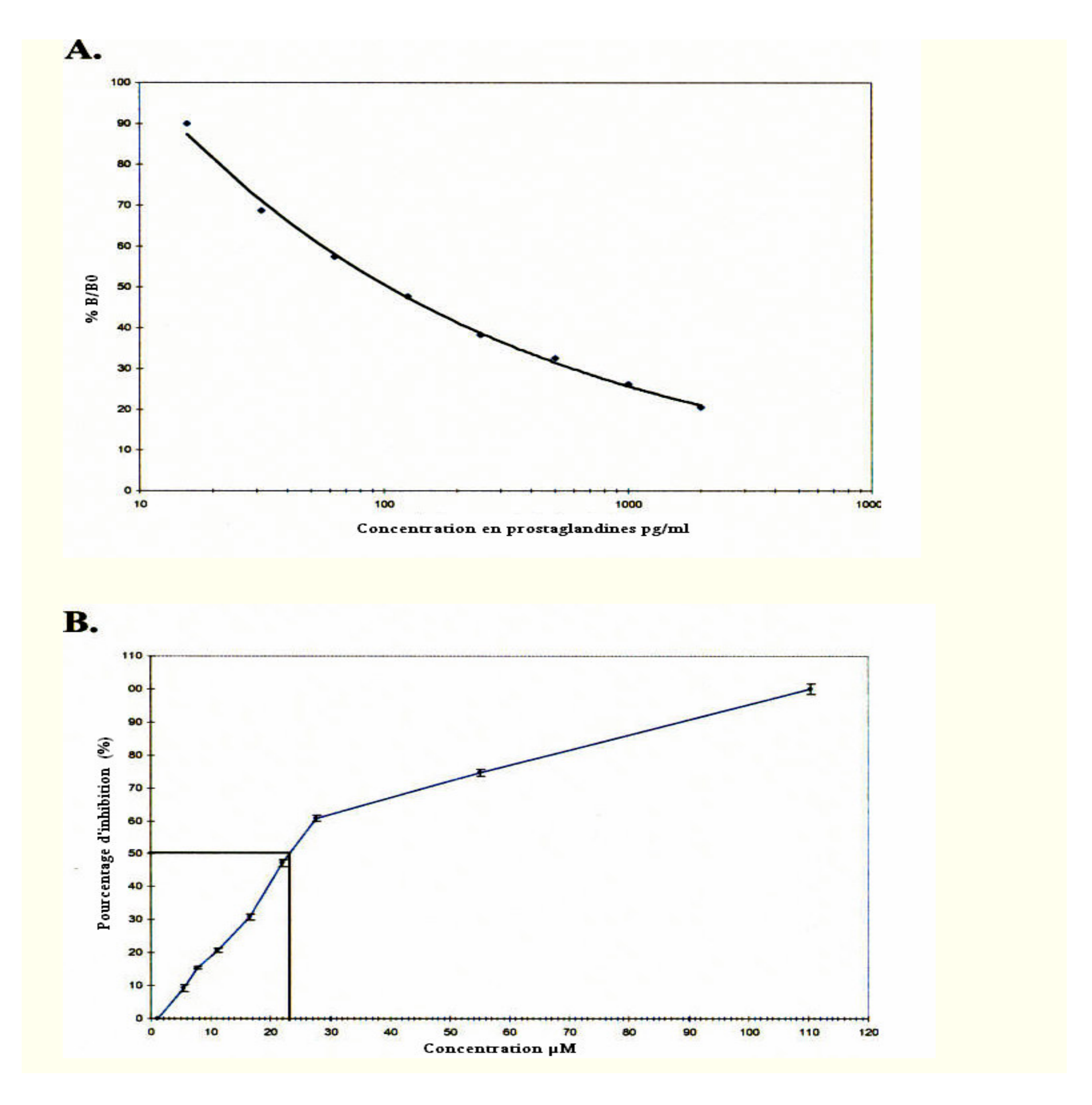


Figure 3.32: En A, courbe d'étalonnage. En B, inhibition de la cyclooxygénase-1 par l'hopéaphénol

3.5.2. Test de production du No

Le monoxyde d'azote (NO^-) est un radical inorganique qui, produit sous l'action d'une NO synthase, intervient en tant que médiateur pro-inflammatoire et dans les réactions immunes. Il peut se fixer aux groupements thiols des protéines pour former des nitrosothiols, molécules biologiquement actives, ou être métabolisé en nitrites et nitrates. Le NO entraîne une vasodilatation et exerce également une grande variété de fonctions comme la régulation immunitaire, la cytotoxicité, la neutralisation des radicaux libres de l'oxygène (Liaudet L. et al, 2000). Le NO est le principal agent d'apoptose (mort cellulaire programmée des chondrocytes). Le nombre de cellules apoptotiques est corrélé à la production de NO. Le NO lui-même peut exercer un rôle positif sur l'expression d'iNOS lorsque sa concentration est faible et un rôle

négatif lorsqu'elle est élevée (en activant et inactivant NF-κB) (Connelly et al., 2001; Umansky et al., 1998).

❖ ***Production du No dans des macrophages péritonéaux des rats***

Les macrophages jouent un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire, via la production de médiateurs biologiques tels que les prostaglandines (PGEs) et l'oxyde nitrique (NO). La synthèse de prostaglandines dépend essentiellement des deux isoformes de la cyclooxygénase, la COX-1 et la COX-2. La première est exprimée de manière constitutive, tandis que la COX-2 est inductible et est exprimée lors de diverses situations physiopathologiques telles que le choc septique et l'inflammation. Le NO est synthétisé par l'oxyde nitrique synthase dont il existe également une forme inductible (iNOS). De nombreuses cellules, dont les macrophages et les cellules endothéliales, expriment les enzymes inductibles COX-2 et iNOS, et produisent ainsi de grandes quantités de prostaglandine E2 (PGE2) et de NO, en réponse à une stimulation par le lipopolysaccharide bactérien. La modulation sélective de la surproduction des ces médiateurs pourrait représenter une cible thérapeutique dans différentes maladies inflammatoires (de las Heras., 2001).

L'activité anti-inflammatoire des composés : engeletin , hopéaphénol, isohopéaphénol, daphnin, ampelopsin A et isoampelopsin A , a été évaluée par l'inhibition de la production d'oxyde nitrique NO et de la prostaglandine E2 (PGE2) dans des macrophages activés par le lipopolysaccharide (LPS). Les macrophages de souris ont été préparés selon la procédure décrite par López-Collazo et al. (López-Collazo, 1998). Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 heures avec du LPS bactérien d'*Escherichia coli* (0.5 µg/ml).

Les produits testés ont été ajoutés aux cellules 30 min avant le LPS. La production de NO et de PGE2 a été mesurée dans les surnageant des cultures. La concentration de PGE2 a été déterminée par un kit ELISA selon les instructions du fabricant. Après conversion de l'oxyde nitrique en nitrite, celui-ci a été mesuré par spectrophotométrie à l'aide du réactif de Griess (Green, 1982).L'effet cytotoxique des composés sur les macrophages a été évalué selon la procédure décrite par Pang et al. (Pang, 1996). La respiration mitochondriale, en tant qu'indicateur de la viabilité des cellules, a été mesurée par la réduction du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure) en formazan. Les cellules ont été exposées aux composés dans des microplaques à 96 puits pendant 24 heures et incubées à 37°C avec le MTT (0.2 mg/ml) pendant 60 min. Le milieu de culture a été enlevé par aspiration, les cellules solubilisées dans du DMSO (100 µl) et la réduction du MTT évaluée par mesure de l'absorbance à 550 nm dans un lecteur de microplaques.

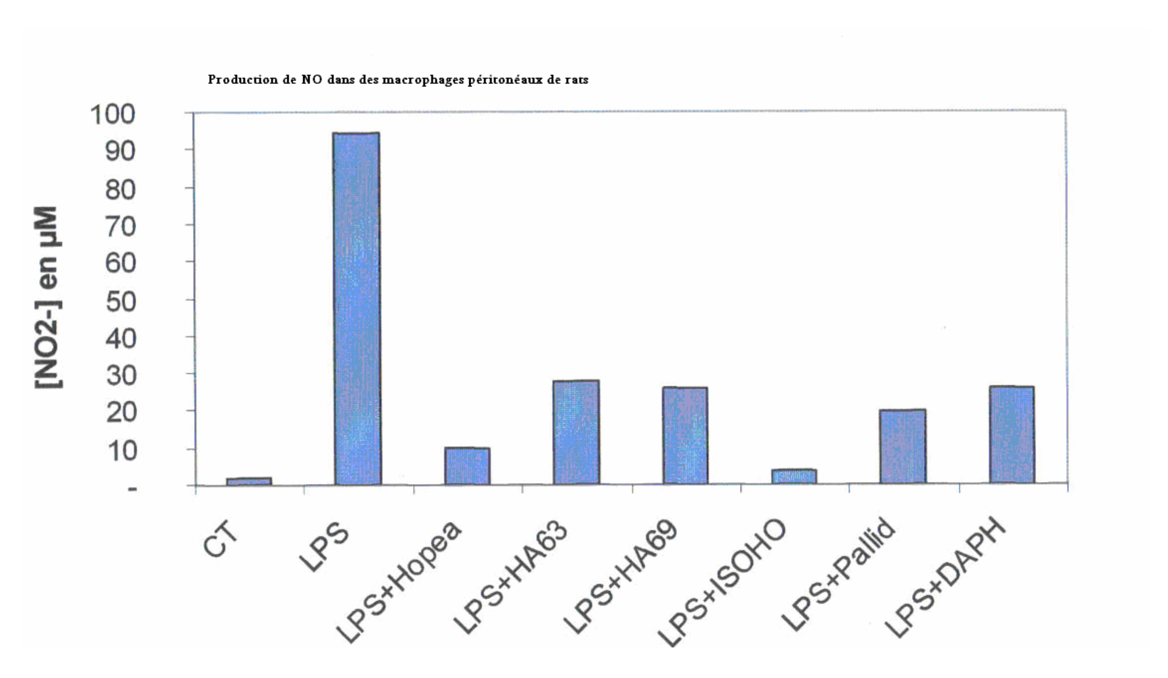


Figure 2.33: diminution de la production de [NO2-] utilisant les composés : Hopea; Hopeaphenol, HA63; Ampelopsin A, HA69 isoampelopsin, Isoho: Isohopeaphenol, pallid: Pallidol, Daph; daphnin

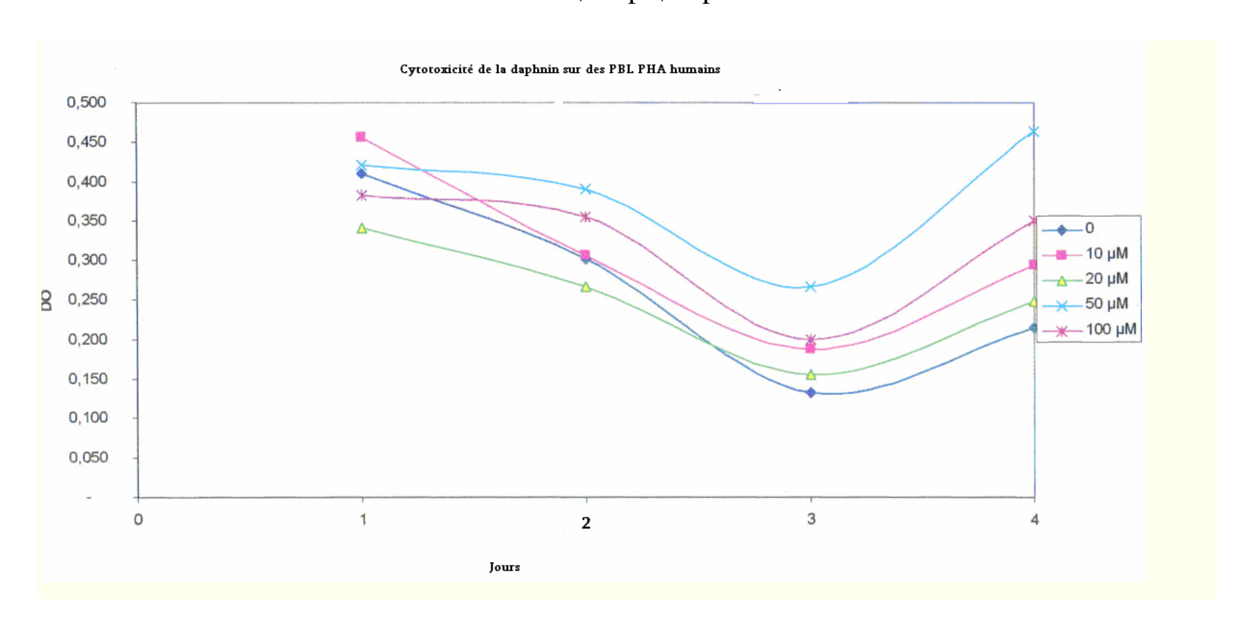


Figure 3.34: Cytotoxicité de la daphnin sur des PBL (Peripheral Blood Leucocytes), PHA (phytohaemagglutinin) humains

Comme le montre la figure (3.33), le composé le plus actif vis-à-vis de la production du NO^{2-} était l'isohopéaphénol suivi de son isomère hopéaphénol ,ces deux composés ont montré une inhibition puissante de la biosynthèse de leukotriene B[4] (LTB[4]) (Kai-Sheng, 2001)qui est un produit du métabolisme de l'acide arachidonique via la voie synthétique 5-lipoxygénase qui est considéré comme la cause de plusieurs pathologies entre autre l'inflammation. La cytotoxicité de ces composés a été testée et les résultats sont montrés sur les figures (3.34) et (3.35) qui montrent

que les composés actifs (ici, daphnin) ne sont pas toxiques sur des PBL PHA humains et PBL CT même à des concentrations de 100 µmol.

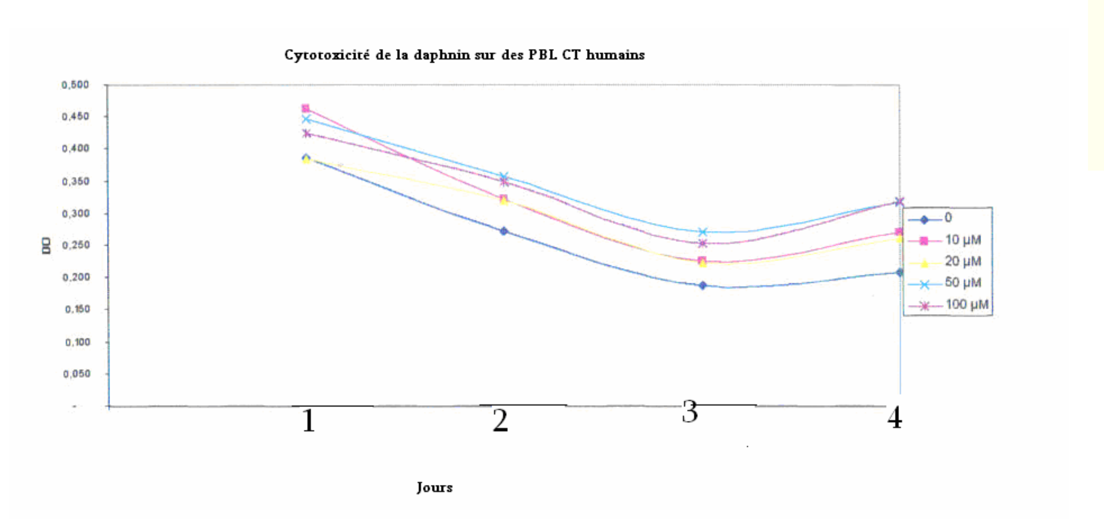


Figure 3.35 : Cytotoxicité de la daphnin sur des PBL CT (cancer testis) humains

3.6. Test de viabilité cellulaire

3.6.1. Détermination de l'effet des polyphénols sur les cellules caco-2

Afin de déterminer l'effet des polyphénols sur la croissance des cellules caco-2, nous avons utilisé le test MTT qui consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. L'effet cytotoxique d'un composé est évalué par le nombre de cellules vivantes, par rapport aux cellules traitées avec le solvant seul. Une lecture spectrophotométrique est réalisée, et l'absorbance obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

3.6.2. Les différents polyphénols

- *Effet des polyphénols au cours du temps :*

Nous avons étudié l'effet de 6 polyphénols à 200 µM sur la croissance cellulaire au cours du temps : le trans resvératrol, trans ε-viniférine, pallidol, isoampelopsin, isohopéaphénol, engeletin et daphnin. La figure (3.36) représente l'absorbance à 595 nm, proportionnelle au nombre de cellules vivantes, en fonction du temps.

Les résultats montrent que, pour une concentration de 200 µM, seul l'isohopéaphénol ne présente qu'une très faible cytotoxicité après 24 heures de contact (7,3 %). Tous les autres polyphénols présentent une inhibition de la croissance cellulaire plus importante variant de 19,5 % pour le pallidol à 27,2 % pour la viniférine (le resvératrol nous sert de témoin : 45,9 % d'inhibition). Par contre après 48 heures de contact, les pourcentages d'inhibition de la

croissance cellulaire sont compris entre 19,3% pour l'isohopéaphénol et 40,5 % pour la viniférine.

- *Effet de la concentration*

La viabilité cellulaire a été déterminée à différentes concentrations de polyphénols variant de 25 à 200 µM, après 48 d'incubation (figure 3.37).

Les résultats montrent que la viabilité cellulaire diminue en fonction de la concentration, et ceci pour tous les polyphénols étudiés. Pour le *trans r*esvératrol, un pourcentage d'inhibition de 46,4 % est déjà atteint pour une concentration de 50 µM et augmente jusqu'à la concentration de 200 µM (63,6 %). Pour la trans ε-viniférine, une inhibition d'environ 40 % est atteinte à la concentration 200 µM. Par contre pour les autres polyphénols, les pourcentages d'inhibition augmentent de façon plus lente et régulière en fonction des concentrations croissantes.

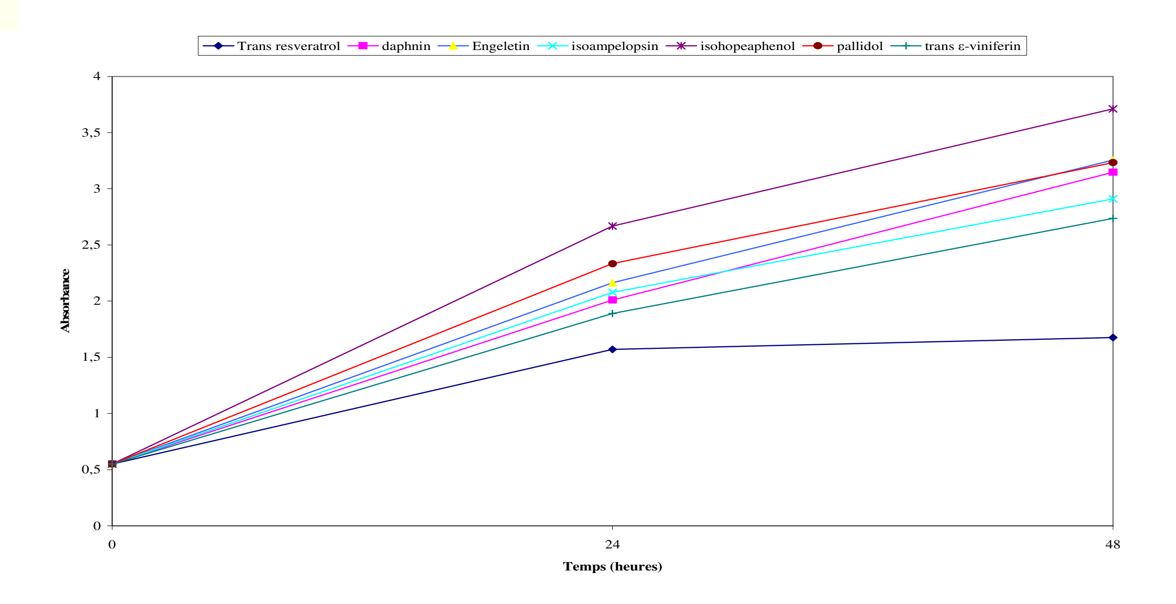


Figure 3.36: Effet des polyphénols (200µM) sur la viabilité cellulaire au cours du temps

(n=4,±écart-type)

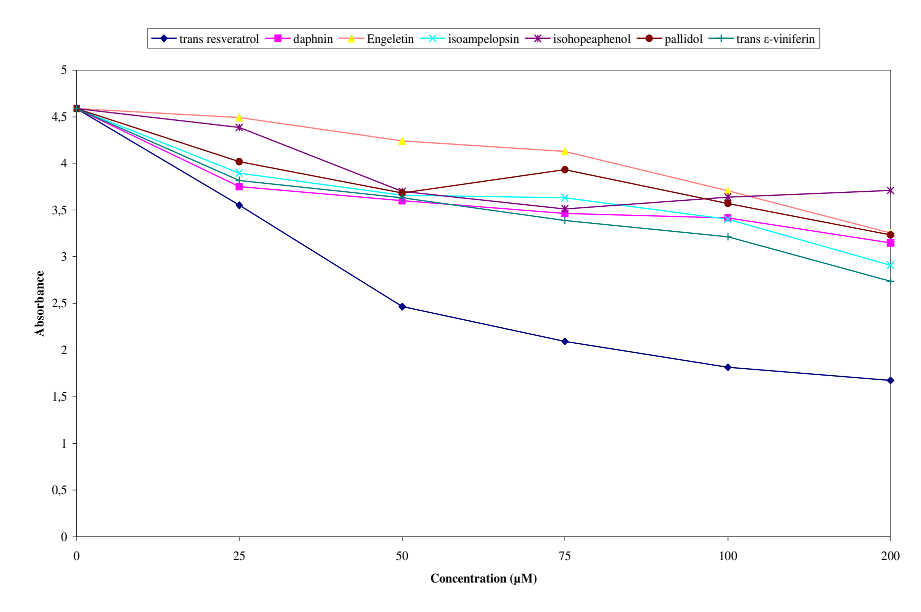


Figure 3.37: Effet des différentes concentrations sur la croissance cellulaire

après 48 heures de contact (n=4,±écart-type).

L'effet antiprolifératif du trans-resveratrol a été étudié sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses, montrant que ce composé présente une IC50 (concentration en trans-resvératrol inhibant la croissance cellulaire de 50 %) comprise entre 20 et 100 µM selon les lignées, après 48 heures de contact (Sgambato, 2001, Sun, 2002). Nos résultats obtenus avec le trans-resvératrol sont en accord avec ceux des auteurs cités.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail entrepris dans cette thèse a été divisé en trois parties :

4.1. POLYPHENOLS IDENTIFIES DANS LES SARMENTS DE *VITIS VINIFERA*

Les méthodes d'extraction et de fractionnement nous ont permis de séparer une vingtaine de molécules dont la structure a été élucidée au moyen de méthodes spectroscopiques, 1H RMN, corrélations 2D, spectrométrie de masse et pouvoir rotatoire :

Les molécules peuvent être classées en trois catégories :

- ***Des monomères de stilbènes :***

Le *trans* resvératrol (trans (3-5-4' trihydroxystilbène)) qui est très fortement majoritaire dans la fraction A de la CPC (riche en stilbènes) des sarments, mais il l'est moins dans les rafles. Ce composé est de loin le plus étudié parmi les stilbènes et a montré des effets bénéfiques pour la santé humaine surtout dans le domaine cardiovasculaire, cancer et maladies neurodégénératives suivi du *trans* picéatannol, (3-5, 3'-5'tetrahydroxystilbène) ces deux composés ont été isolés de la fraction (33-60) du mode ascendant et le picéide (5-4'-dihydroxystilbène-3-beta-D-glucopyranoside) a été isolé à partir de la fraction 9-13 du mode descendant.

- ***Des dimères du resvératrol (viniférines):***

La (+) *trans* ε-viniférin, la *cis* ε-viniférin, la (-) *trans* ε-viniférin, la δ-viniférine, la parthénocissine A, la cyphostemmin B, l'ampelopsin D, la *trans* scirpusin A ont été isolés à partir du mode ascendant de la CPC (fraction 33-60). Le pallidol, l'ampelopsin A et un isomère de l'ampelopsin A (structure non entièrement élucidée) ont été isolés à partir de la fraction (3-4) du mode descendant. Des études ont montré que les dimères tels que l'ε-viniférine sont le résultat d'une oxydation enzymatique du resvératrol.

- ***Des tétramères du resvératrol:***

A partir du mode descendant de la CPC du système 2, nous avons isolé quatre tétramères du resvératrol : l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol (dimères de l'ampelopsin A), le nepalensinol B et le viniferol E et trois autres tétramères dont la structure n'est pas encore établie avec certitude et des analyses RMN et/ou méthodes chimiques sont encore nécessaires. Concernant la biosynthèse des tétramères, ils semblent provenir de l'oxydation des dimères en présence de peroxydases.

- ***Deux dihydroflavanols*** :

L'astilbin et l'engeletin isolées du mode descendant, fraction (9-13).

Tous ces composés ont aussi été présents dans les rafles avec des concentrations ± importantes.

4.2. DOSAGE DE POLYPHÉNOLS DANS LES VINS DE L'AFRIQUE DU NORD :

Le vin Merlot d'Algérie a été soumis au fractionnement et cinq stilbènes (*trans*-resveratrol, *trans*-picéide, *trans* ε-viniférine, pallidol, hopéaphénol) et un dihydroflavanol (astilbin) ont été purifiés.

Par ailleurs, les composés isolés ont été quantifiés dans dix échantillons de vins de l'Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie).

L'occurrence de l'hopéaphénol comme constituant naturel du vin est reporté dans cette étude, pour la première fois (Amira-Guebailia, 2006). La valeur maximale d'hopéaphénol détectée dans les échantillons étudiés était de 3.8 mg/L dans la variété Ksar (vin rouge Marocain). Une concentration considérable en hopéaphénol (3.06mg/L) a été trouvée dans le vin blanc Muscat.

La comparaison des résultats a montré des différences en concentration variant en mg/L de : 4.6 à 45 *trans*-picéide, 0.66 à 3.45 *trans*-resveratrol, 0.2 à 1.2 *trans* ε-viniférine, 0.2 à 9.2 pallidol, 0.3 à 3.8 hopéaphénol, 10.8 à 24.22 (astilbin).

Nos résultats montrent aussi que les vins Africains contiennent des quantités élevées de dérivés du *trans*-resveratrol notamment *trans*-picéide, ainsi que les flavonoïdes notamment astilbin. Les concentrations de 24.22 mg/L (Guerouane) et 45 mg/L (Cuvée de président) ont été trouvées pour l'astilbin et le *trans*-piceid, respectivement alors que les valeurs maximales cernées dans la littérature jusque là sont 15 mg/L pour l'astilbin et 30 mg/L pour le *trans* piceid.

Nous avons trouvé dans le vin blanc étudié (Muscat) la concentration maximale de pallidol (9.2 mg/L), cette valeur est supérieure à la valeur maximale reportée dans la littérature pour les vins rouges (7 mg/l). La concentration en hopéaphénol du muscat est proche de celle de la variété Merlot alors que son niveau de stilbènes totaux est comparable à celui des trois vins rouges ; Cabernet-Sauvignon, Ksar et Terrale. Ces trouvailles aussi surprenantes soient elles sont très intéressantes vue que, jusqu'à maintenant, le *trans* resvératrol est le seul stilbène quantifié dans le vin blanc.

4.3. TESTS BIOLOGIQUES

L'hopéaphénol a été testé pour son effet anti-inflammatoire, une IC50 de 23 µM a été trouvé vis-à-vis de la COX-1. L'inhibition de la COX 2 était de 43.3% (concentration > 100 µmol) donc, l'IC50 n'a pas été calculée. L'hopéaphénol possède donc un potentiel anti-inflammatoire non négligeable mais il reste toutefois cinq fois inférieur à celui du *trans* resvératrol.

Sept molécules ont été testées contre la production de monoxyde d'azote (médiateur inflammatoire) dans des macrophages péritonéaux de rats et l'isohopéaphénol (tétramère du resvératrol) était le plus actif suivi de l'hopéaphénol et du pallidol. La daphnin, (glucoside de coumarine) l'ampelopsin A et l'iso-ampelopsin A ont montré une inhibition presque comparable.

Concernant les tests de viabilité cellulaire le *trans* resvératrol, a montré une inhibition de 46,4 % pour une concentration d'environ 50 µM, suivi de la trans ε-viniférine qui a montré une inhibition de 40% mais à 200 µM, l'activité des autres polyphénols était moindre.

4.4. PERSPECTIVES

Nous avons travaillé que sur la phase organique, il reste la phase aqueuse des sarments à explorer, des tests de fractionnement ont été entamés montrant l'existence de glucosides et c'est très possible qu'il s'agit de stilbènes glycosilés.

Plusieurs molécules sont en cours d'identification et sont prometteuses, en l'occurrence, des tétramères de resvératrol.

Dans la fraction 1-2 du mode descendant du système 2, la spectroscopie de masse a montré l'existence d'octamères de resvératrol, des méthodes chromatographiques peuvent être mises au point pour la purification de ce type de molécules, et ce serait très original, car dans la vigne, le plus haut degré de polymérisation atteint pour les stilbènes est 4.

Le travail présenté dans cette thèse concernant les vins de l'Afrique du nord représente très peu de ce qu'il reste à faire, car plusieurs molécules sont isolées et ne sont encore pas identifiées et bien d'autres restent à purifier, d'autres cépages non présentés dans cette thèse méritent aussi d'être explorés.

Pour les tests biologiques, l'isohopéaphénol a donné un résultat très intéressant concernant la production de NO, ce qui incite à aller plus loin et tester cette molécule contre diverses lignées cellulaires cancéreuses. Les autres molécules ayant donné une activité intermédiaire sont en cours d'utilisation pour d'autres types de tests, telle que l'induction de l'apoptose et l'activité anti-amyloidogénèse (maladie d'Alzheimer).

5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aggarwal B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N. P., Shishodia S., Takada Y. (2004). Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer:Preclinical and Clinical Studies, Anticancer research *24*.

Alarcon de la Lastra C., Villegas I. (2005). Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 405-430.

B

Baderschneider B., Winterhalter P. (2000). Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, *48*, 2681-2686

Bala A.E.A., Kollman A., Ducrot P.-H., Majira A., Kerhoas L., Leroux P., Delorme R., Einhorn J. (2000). Cis ε- viniferin: A new antifungal resveratrol dehydrodimer from Cyphostemma crotalariodes roots. J. Phytopathology 148,
29–32.

Baldi a., Romani A., Mulinacci N. (1995). HPLC/MS application to anthocyanidins of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2104-9.

Bate-Smith E. C. (1986). Astringency in foods. *Food Processing* **23**, 1954. 124-35.

Baur J. A., Sinclair D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol, the *in vivo* evidence., *Nature*, 5, 493-506.

Being-Sun W., Ming-Chun H., Chun-Ching ., Chia-Wen H.(**2006**). Piceatannol upregulates endothelial heme oxygenase-1 expression via novel protein kinase C and tyrosine kinase pathways. Pharmacological Research 53 113–122.

Benzie I. F. F , Szeto Y. T.(1999) .Total antioxidant capacity of teas by the Ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 633-6.

Billard C., Izard J.C., Roman V., Kern C., Mathiot C., Mentz F., Kolb J.P. (**2002) .**Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukaemia cells and normal human lymphocytes. *Leuk.Lymphoma*, *43*, 1991-2002.

Block G., Patterson B., Subar A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, **18**, 1-29.

Bohm H., Boeing H., Hempel J. (1998). Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernahrungswissenschaft* **37**(2), 147-63.

Boileau T.W., Liao Z., Kim S., Lemeshow S., Erdman J.W., Clinton S.K. (**2003).** Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *J.Natl.Cancer Inst.*, *95*, 1578-1586.

Bokel M., Diyasena C. M. N., Gunatilaka A. A. L., Kraus W., **Sotheeswaran S.** (**1988**). Canaliculatol, an antifugal resveratrol trimer from *Stemonoporous canaliculatus*. *Phytochemistry* **27**(2), 377-80.

Boudonneu M. (1990). La détection inverse en RMN, *Analysis n°1*, Vol. 18.

Boukharta M., Girardin M., Metche M. (1988). Procyandines galloylées du sarment de la vigne (*Vitis vinifera*): séparation et identification par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography* **455**, 406-9.

Bourzeix M., Weiland D., Heredia N. (1986). A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l'O.I.V* 669-670, 1173-254.

Bravo L. (**1998**). Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significanceNutr Rev,56,11:317-333.

Brouillard R., Chassaing S., Fougerousse A.(**2003).** Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry*, *64*, 1179-1186.

C

Canet D., (1991). La RMN : concepts et méthodes. Inter éditions. Paris.

Carando S., Tesseidre P.L., Pascual-M. L.,Cabanis J.C. (1999). Levels of flavanol-3-ols in French Wines, j.Agric.Food Chem.**,** 47, 4161-4166.

Carando S., Teissendre P.L, Waffo-Teguo P., Cabanis J.C., Deffieux G., Merillon J.M. (1999). High performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of Trans-Astringin in wine. *Journal of chromatography A***,** 849, 617-620.

Chantret I., Barbat A., Dussaulx E., Brattain M.G. , Zweibaum A. (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* **48**:1936-42.

Chung E.Y., Kim B.H., Lee M.K., Yun Y.P., Lee S.H., Min K.R. ,Kim Y. (2003). Anti-inflammatory effect of the oligomeric stilbene alpha-Viniferin and its mode of the action through inhibition of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. Planta Med, 69: 710-714.

Cichewicz RH ,Kouzi SA (2002). Resveratrol oligomers: structure, chemistry, and biological activity. J Nat Prod Chem *26*: 507-579

Closa D., Torres M., Hotter G., Bioque G., Leon O.S., Gelpi E. , Rosello-Catafau J. (1997) .Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 56, 331.

Coggon P., Janes F. E., King T. J., Molyneux R.J, Morgan, J.W.W. (1965). Hopeaphenol, an extractive of the heartwood of Hopea ordorata and Balanocarpus heimi*, J. of the Amer.Chem. Society*, 406-409.

Connelly L. ,Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A.J. (2001). Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxideJ Immunol. Mar 15,166(6):3873-81.

Creasy L. L. , Coffee M. (1988). Phytoalexin production potential of grape berries. J Am Soc Hort Sci *113*: 230-234.

Czochanska Z., Yeap Foo L., Porter L. J (1979). Composition changes un lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* **18**, 1819-22.

D

Dai J.R., Hallockm Y. F.,Cardellina J. H., Boyd M.R. (1998). HIV-inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*. *J. Nat. Prod.*, 61, 351-353.

Delaunay J. C., Castagnino C., Chèze C., Vercauteren J. (2002). Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis* V*inifera* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr . A*, *964*, 123-128.

De Lange D.W., Van Golde P. H., Scholman W.L.G., Kraaijenhagen R.J., Akkerman J. W. N., van de Wiel A. 2003 Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation. *Eur. J. of Inter. Medicine* ,14, 361–366.

De las Heras B., Navarro A., Diaz-Guerra M. J., Bermejo P., Castrillo A.,Bosca L., Villar A. (1999). Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-κB andalusol. *Br. J. Pharmacol.* 128, 605-612.

Dion R., (**1959**) .*Histoire de la vigne et du vin en France des origines au XIXème siècle*, Paris.

Dreosti I.E. (**2000).** Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, *16*, 692-694.

Ducrot P.H., Bala A. , Kollmann A. , Majira A. , Delorme R. , Einhorn J.(1998). Cyphostemmins A-B, two new resveratrol dehydrodimers from cyphostemma crotalarioides. *Tetrahydron . Letters* ,39, 9655-9658.

Durbin M.L., Lundy K.E., Morrell P.L., Torres-Martinez C.L., Clegg M.T. **(2003) .**Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations. *Mol.Phylogenet.Evol.*, *29*, 507-518.

Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A. (**2003).** Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc.Nutr.Soc.*, *62*, 599-603.

E

Escribo-Bailon M. T., Guerra M. T., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. (1995). Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **200**, 221-4.

Escribo-Bailon M. T., Gutierrez-Fernandez Y., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C. (1992). characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1794-9.

F

Ferrigni NR, McLaughlin JL, Powell G, Smith CR. (**1984**). Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. J Nat Prod 47:347–52.

Frankel E. N., Waterhaouse A. L. , Kinsella J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **341**, 1103-4.

Frankel E., Kanner J., German J. B., Parks E., Kinsella J. E. (1993). Inhibition of oxidation of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, *341*, 454-457.

Frei B., Higdon J.V. (**2003).** Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J.Nutr.*, *133*, 3275S-3284S.

Fuendjiepa V., andjib J., Tillequinc F., Mulholland D.A, Budzikiewicze H., Fomumb Z.T., Nyembab A.M., Kochc M. (2002) . Chalconoid and stilbenoid glycosides from Guibourtia tessmanii, phytochemistry 60 803–806.

Fuko F., Yue-Hua H., Kenji T., Yoshiaki T., Masatake N. (**2005**). Three new stilbeneoligomers from the roots of Vitis vinifera 'Kyohou', *Heterocycles*, 65, 2461-2469.

Fujioka Furimi K., Fujih H., Okabe H., Mihashi K., Nakano Y., Atsunage H., Katano M., Mori M. (1999). Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica* Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 47(1): 96-100.

Fylaktakidou K.C., Hadjipavlou-Litina D.J., Litinas K.E*.*, **(2004).** Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities , *Curr Pharm Des, 10(30) :3813-33.*

G

Garcia-Argaez A., Delgado H.P., Velazquez G., Martinez-Vazquez M. (2000) .Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model Planta Med. 66: 279-281.

Gaziano J. M., Buring J. E., Breslow J. L., Goldhaber S. Z., Rosner B., VanDenburgh M., Willett W., Hennekens C. H (1993). Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *National English Journal of Medicine*, 329,1829–1834.

German J.B., Walzem R.L. (**2000).** The health benefits of wine. *Annu.Rev.Nutr.*, *20*, 561-593.

Goetz G, Fkyerat A., Métais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R., Pont V. (1999).Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**, 759-67.

Golberg D.M., Ng E., Karumanchi A. , Yan J., Diamandis E.P., Soleas G.J. (1995). Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography.*J. of Chromatogr.,* **708**, 89-98.

Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skiper P. L., Wishnok J. S. Tannenbaum S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and 15N in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-136.

Gunther H., (1994). La spectroscopie de RMN, Masson, Paris.

H

Haraguchi H., Mochida Y., Sakai S., Masuda H.,Tamura Y., Mizutani K., Tanaka O., Chou W. H. (1996). Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, *60*, 945-948.
Harborne J.B., Williams C.A. (**2000**). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*, 481-504.

Haslam E. (1980). *In Vino veritas*: oligolmeric procyanidins and the ageing of red wines.*Phytochemistry* **19**, 2577-82.

Haslam E. (1998). Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, Cambridge.

Hauner H., Watzl B. (**2001**)**.** Antioxidants in nutrition and arteriosclerosis *tsch.Med.Wochenschr.*, *126*, 213-217.

Hemingway R. W., McGraw G. W. (1983). Kinetics of acid-catalysed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **3**(4), 421-35.

Hemingway R. W. (1992). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives, *in* "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York .

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Van de Putte B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoïds of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1242-6.

Holvoet P. (2004). Oxidized LDL and coronary heart disease., *Acta Cardiol.*, 59, 479-484.

Hostettmann K., Marston A. (2002). Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* **1**: 275-285.

Houghton P. J. ,Raman A., (1998). Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. Chapman et Hall, Londres, 1ère éd., 29-31.

Huang K.S., Lin M., Cheng G.F. (**2001**). Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of Vitis amurensis and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. Phytochemistry 58, 357–362.

I

Igarashi K., Uchida Y., Murakami N., Mizutani K.,Masuda H. (1996). Effect of astilbin in tea processed from leaves of *Engelhardtia chrysolepis* on the serum and liver lipid concentrations and on the erythrocyte and liver antioxidative enzyme activities in rats. *Biosci.,Biotechnol., Biochem.*, *60*, 513-515.

Ito J Gobaru K., Shimamura T., Niwa M. (1998). Absolute configurations of some oligostilbenes from Vitis coignetiae and Vitis vinifera 'Kyohou'. *Tetrahedron*,*54,* 6651-6660.

Ito J., Niwa M., Oshima Y. (1997). A new hydroxystilbene tetramer named isohopeaphenol from Vitis vinifera 'Kyohou'. *Heterocycles***,** *45*1, 809-1913.

J

Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn, A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997) .Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 275: 218-220.

Jeandet P., Bessis R., Maume B. F., Meunier P., Peyron D., Trollat, P. 1995a Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J. Agric. Food Chem.*, *43*,316-319.

Jumarie C., Malo C. (1991). Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* **149**:24-33.

K

Kayser O. (**1997).** "Antibacterial activity of extracts and constituents of Pelargonium sidoides and Pelargonium reniforme." Planta Med., 63(6): 508–10.

Kawabata J., Ichikawa S., Kurihara H., Mizutani J. (1989). Kobophenol A , a unique tetrastilbene from *Carex Kobomugi ohwi* (Cyperaceae). *Tetrahedron Letters* **30**(29), 3785-8.

Khan M. A., Shah G., Satya P. ,Asif Z. (1986). Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida Phytochemistry, Volume 25, Issue 8, 17 July, Pages 1945-1948.*

Kim H. J., Chang E. J.,Cho S. H., Chung S. K., Park H.D. ,Choi S.W., (2002) ."Antioxidative Activity of Resveratrol and Its Derivatives Isolated from Seeds of *Paeonia lactiflora*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**,1990-1993.

Kimura Y., Okuda H., Arichi S. (**1985**). Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. Biochim Biophys Acta,834: 275-278.

Kimura Y., Okuda H. (**2000**). Effects of Naturally occurring stilbene glycosides from medicinal plants and wine, on Tumour growth and Lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing Mice. J. Pharm. Pharmacol.,52:1287-1295.

Kindl H. (1985). Biosynthesis of stilbenes, *in* "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" Academic Press.

Kobayashi K., Ishihara T. , Khono E., Miyase T., Yoshizaki F. *Tohoku* (2006).Constituents of Stem Bark of *Callistemon rigidus* Showing Inhibitory Effects on Mouse α-Amylase Activity, *Biol. Pharm. Bull.* 29(6) 1275—1277.

Kuulasmaa K., Tunstall-Pedoe H.,Dobson A., Fortman S.,Sans S., Tolonen H.,Evans A., Ferrario M., Tuomilehto J.(2000). Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*, 335, 675–687.

L

Lacaille-Dubois M.-A. ,Wagner H. (1996). Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica* **143**(6), 555-62.

Lairon D., Amiot M.J. (1999). Flavonoids in food and natural antioxidants in wine.Curr Opin Lipidol , 10 : 23-28.

Lamuela-Raventos R. M., Romero-Perez A., Waterhouse A. L., Torre-Boronat M. C.(1995). Direct HPLC analysis of cis- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red Vitis vinifera wines. *, j. of agr. and food chem*. (281–283.

Lamuela-Raventos R.M., Waterhouse A.L. (1994). A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 1-5.

Landrault N., Larronde F., Delaunay J.C., Castagnino C., Vercauteren J. , Merillon J.M., Gasc F., Cros G., Teissedre PL. (**2002).** Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development, *J. Agric. Food Chem.* ,50, 2046-2052.

Landrault N., Poucheret P., Ravel P., Gasc F., Cros G., Tesseindre P.-L. (2001). Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages*, j.Agric.Food.Chem.,* 49, pp3341-3348.

Langcake P. ,Pryce R.-J. (1977). a A new class of phytolalexins from grapevines. *Experientia* **33**, 151-2.

Langcake P. (**1981**). Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol, ε-viniferin, α−viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **9**, 77-86.

Langcake P ,Pryce RJ (**1976**). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaseae as a response to infection or injury. Physiol Plant Pathol *9*: 77-86.

Lee E.O. , Kwonb B.M., Songc G.Y. , Chaed C. H., Kime H. M., Shima I.S., Ahne K.-S., Kima S. H. (**2004**).Heyneanol A induces apoptosis via cytochrome c release and caspase activation in human leukemic U937 cells, *Life Sciences* 74 2313–2326

Lee E-O., Lee H.J., Hwang H.S., Ahn K.S., Chae C., Kang K.S., Lu J, Kim S.H. (2006). Potent binding inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of Vitis amurensis through apoptotic and anti-angiogenic activities, c*arcinogenesis,* October 1, 27(10): 2059 - 2069.

Li W.W., Ding L.S., Li B.G., Chen Y.Z., (1996). Oligostibenes from vitis heyneana. Phytochemistry 42, 163–1165.

Liaudet L., Soriano F., Szabo C. (2000). Biology of nitric oxide signalling. Crit Care Med , 28 : N37-N52.
Lin M., Li J.-B., Li S.-Z., Yu D. Q., and Liang X. T. (1992). A dimeric stilbene from Gnetum P*arvifolium*. *Phytochemistry* **32**(2), 633-8.

Lino C.S., Taveira M.L., Viana G.S.B., Matos F.J.A. (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents:coumarin and umbelliferone Phytother. Res. 11: 211-215.

Lopez- Collazo E., Hortelano S., Rojas A. Bosca, L. (1998). Triggering of Peritoneal Macrophages with IFN-α/βAttenuates the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Through a Decrease in NF-κB Activation. *J. Immunology* 160, 2889-2895.

Lu K. T., Chiou R. Y. Y., Chen L. G., Chen M. H., Tseng W. T., Hsieh H. T., Yang Y. L. (2006). Neuroprotective Effects of Resveratrol on Cerebral Ischemia-Induced Neuron Loss Mediated by Free Radical Scavenging and Cerebral Blood Flow Elevation., *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3126-3131.

Lu Y Yeap Foo L. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace Food Chemistry 65, 1-8 (TR 412).

M

Marambaud P., Zhao H., Davies P. (2005). Resveratrol promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid-β Peptides., *J.Biol. Chem.*, 280, 37377-37382.

Marier J.F. ,Chen K., Prince P., Scott G., del Castillo J. R. E., Vachon P. (**2005).** Production of ex-vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependant manner., *The Canadian J. Vet. Res.*, 69, 151-154.

Masayoshi O., Toshiyuki T., Tetsuro I., Munekazu I., Kenneth F.B, Kuo-Hsiung L. (1999). Antitumor agents 2000 , Cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. *Biorganic &Medicinal Chemistry Letters***,** 9, 3057-3060.

Matsuda H., Kageura T., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M. (**2000**). Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. Bioorg Med Chem Lett,10:323.

Matsuda H., Tewtrakul S., Morikawa T., Yoshikawa M. (2004). Anti-allergic activity of stilbenes from Korean rhubarb (Rheumundulatum L.): structure requirements for inhibition of antigen-induced degranulation and their effects on the release of TNF-a and IL-4 in RBL-2H3 cells Bioorganic & Medicinal Chemistry 12 4871–4876.

Mattace Raso G., Meli R., Di Carlo G., Pacilio M., Di Carlo R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci. 68* ,921-931.

Mattivi F. (1993). Solid phase extraction of *trans* resveratrol from wines for HPLC analysis *Z.Lebensm,Unters,Forsch*., 196,522-525.

Mattivi F., Reniero F., Korhammer S. (1995). Isolation, characterization,and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.*, *43*, 1820-1823.

McMurtey K. D. (**1997).** Resveratrol in wine, Wine nutritional and therapeutic benefits. ACS Symposium Series,661,44-55.
Mishima S., Matsumoto K., Futamura Y., Araki Y., Ito T,Tanaka T., Iinuma M., Nozawa Y., Akao Y. (2003).Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model. J Exp Ther Oncol, 3: 283-288.

MosmannT. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol.*, **65**, 55–63.

Murias M., Jager W., Handler N., ErkerT. , Horvath Z., Szekeres T., Nohl H., Gille L. (2005). Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure–activity relationship, Biochemical Pharmacology 69, 903-912.

O

Ohyama M., Ichise M., Tanaka T., Iinuma M., Burandt J. (1996). Davidiol D, first occuring resveratrol pentamer isolated from *Sophora davidii*. *Tetrahedron Letters* **37**(29), 5155-8.

Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M. (1994). A novel stilbene tetramer, Leachianol C, isolated from *Sophora leachiana*. *Tetrahedron Letters* **35**(42), 7817-20.

Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M., Goto K. (**1994**). Two novel resveratrol trimers, Leachianols A and B, from *Sophora leachiana*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **42**(10), 2117-20.

Orallo F. (2006). Comparative Studies of the Antioxidant Effects of *Cis*- and *Trans*-Resveratrol., *Curr. Med. Chem.*, 13, 87-98.

Oshima Y., Namao K., Kamijou A., Matsuoka S. , Nakano M., Terao K., Ohizumi Y., (1995). Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant Vitis coignetiae (Vitaceae). Experientia 51 (1),63-66.

P

Pace-Asciak C. R., Hahn S., Diamandis E. P., Soleas G., Goldberg D. M. (1995). Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin. Chim. Acta.* , 235,207-219.

Pang L., Delas Heras, B., Hoult J. R. S. (1996). A Novel Diterpenoid Labdane from *Sideritis javalambrensis* Inhibits Eicosanoid Generation from Stimulated Macrophages But Enhances Arachidonate Release. *Biochem. Pharmacol.* 51, 863-868

Paterson R., Bridge P. D. (1994). Biochemical techniques for filamentous fungi. *IMI Technical Handbooks: No1*, International Mycological Institute: U.K.

Perret C. (2001). Thèse, Neuchâtel, Suisse.

Pezet R., Perret C., Julien Bernard J.D., Tabacchi R., Gindro K., Viret O. (2003). δ-Viniferin, a resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthetised by Stessed Grapevine Leaves*, j. of agr. and food chem.***,** 51,5488-5492.

Plumb G. W., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C. (1998). Antioxidant properties of catechins and procyanidins: effect of polymerization gallylation and glycosylation. *Free Radical Research* **29**, 351-8.

Potter GA., Patterson LH., Wanogho E., Perry P.J., Butler PC., Ijaz T, Ruparelia K.C., Lamb J.H., Farmer P.B., Stanley L.A. , Burke M.D. (**2002**). The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1, British Journal of Cancer 86, 774 – 778.

Principe P.P. (1989). The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R. (eds.), *Economic and Medicinal Plant Research*, *Volume 3*. Academic Press, London.

Piver B., Berthou F., Dreano Y., Lucas D. (2003). Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ε-viniferin ,the dimmer of resveratrol :comparison with resveratrol and Polyphenols from alcoholised beverages.**,** *Life Sci*.**,** 73, 1199-1213.

Potter J.D. (**1997).** Cancer prevention: epidemiology and experiment. *Cancer Lett. 114*, 7-9.

Potter J.D, **Steinmetz K. (1996) .**Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents.*IARC Sci.Publ.*, 61-90.
Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M (1994) . Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **36**(3), 781-4.

Privat C., Telo JP., Bernardes-Genisson V. (1976). Antioxidant properties of trans-epsilon-viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. J.Agric Food Chem 2002 **50,** 1213–1217.

Q

Quineya C., Dauzonneb D., Kerna C., Fourneronc J.D., Izardd J.C., Mohammade R. M., Kolba J. P., Billard C. (**2004).** Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukaemia B-cells. *Leukaemia Research***,** 28, 851-861.

R

Rafter J.J. (2002). Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br.J.Nutr.*, *88 Suppl 2*, S219-S224.112.

Remy S. (**1999**). Les tannins du vin rouge:caractérisation de structures natives et derivées. Thèse de l'INRA (Montpellier).

Renaud S., De Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets and the French paradoxon for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523–1526.

Renaud S., Guéguen R., Siest G. ,Salamon R. (1999). Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France. Arch. Intern. Med., 159, 1865-1870.

Ribeiro de Lima M. T., Waffo-Teguo P. , Teissendre P.L. , Pujolas A., Vercauteren J. , Cabanis J.C. , Merillon J.M. (1999). Determination of Stilbenes (trans-Astringin,cis- and trans-Piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguse Wines. *j.agric.Food Chem.*,47,2666-2670.

Ribereau-Gayon P., (1968). Les composés phénoliques des végétaux.

Ricardo-da-Silva J. M., Belchior A. P., Spranger M. I., Bourzeix, M. (1992). Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. *sciences des Aliments* **12**, 223-37.

Ricardo-da-Silva J. M., Darmon N., Fernandez Y. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**(9), 1549-52.

Roggero J.P. , Archier P. (**1994).** Quantitative determination of resveratrol and of one of its glycosides in wines *Sci. des Aliments* , 14, 99-107.

Ricardo-da-Silva J. M., Rigaud J., Cheynier V., Cheminat A., Moutounet M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* **30**(4), 1259-64.

Roy M., Chakrabarty S., Sinha D., Bhattacharya R.K., Siddiqi M. (**2003).** Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat.Res.*, *523-524*, 33-41.

S

Sahidin H.E.H., Juliawaty L.D., Syah Y.M., Bin Din L., Ghisalberti E.L., Latip J., Said I.M., Achmad S.A. (2005). Cytotoxic properties of oligostilbenoids from tree barks of Hopea dryobalanoides. *ZNaturforsch[C]*, **,** 60, 723-7**22.**

Sardari S. Mori Y., Horita K., Micetich R.G., Nishibe S., Aneshtaleb M. (1999). Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins Bioorg. Med. Chem. 7(9): 1933-1940.

Sarker S. D., Whiting P., Dinan, L.(1999). Identification and ecdysteroid antagonist activity of three resveratrol trimers (suffruticosols A, B and C) from *Paeonia sufffuticosa*. *Tetrahedron* **55**, 513-24.

Schmeda-Hirschmann G., Gutierrez M. I., Loyola J. I.' Zuniga J., (1996). Biological activity and xanthine oxidase inhibitors from Scirpus californicus, Phototherapy research, 10, 683-685.

Sgambato A., Ardito R., Faraglia B., Boninsegna A., Wolf F.I. , Cittadini A . (2001). Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res* 496**:** 171-180.

Siemann E.H., Creasy L.L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* , **43** (1), 49-52.

Singleton V. L., Timberlake C. F., Lea A. G. H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of sciences and Food Agriculture* **29**, 403-10.

Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M. (1997). Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *J. Clinical Labo. Analysis*, 287 – 313**.**

Souquet J. M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **43**(2), 509-12.

St Leger A., Cochrane A.L., Moore F. (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet,* 1:1017–1020.

Stoclet J. C. ,Chataigneau T. , Ndiaye M. ,Oak M. H. , El Bedoui J. ,Chataigneau M. , Schini-Kerth V. B. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology* , 500, 299–313.

Su C. T., Singleton V. L. (2001). Identification of three flavan-3-ols from grapes.*Phytochemistry* **8**, 153-1558.

Su L., David M. (**2000**). Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon _/_ receptor: selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. J Biol. Chem., 275:12661-6.

Sultanbawa M., Surendrakumar S., Wazeer M. I. M. (1981). Novel resveratrol tetramer, Vaticaffinol, from *Vatica affinis* Thw. (Dipterocarapaceae). *Journal of the American Society Chemical Communications,* 1204-6.

Sun A.Y., Simonyi A., Sun G.Y. (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol [J]. Ann N Y Acad Sci , 957: 210-229.

T

Takaoka M. (1940). The phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.), J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ., ser. III3 (1) 1–16.

Takaya Y., Yan K.-X., Terashima K., He Y.-H., Niwa M. (2002). Biogenetic reactions on stilbenetetramers from Vitaceaeous,plants. *Tetrahedron,58*,9265-9271.

Tanaka T., Ito T., Ido Y., Son T.K., Nakaya K., Iinuma M., Ohyama M. ,Chelladurai V. (2000). Stilbenoids in the stem bark of Hopea parviflora , Phytochemistry 53, 1015-1019.

Tanaka T., Iinuma M., Murata H. (**1998). Stilbene derivatives in the stem of Parthenocissus quinquefolia ,** *Phytochemistry*, Volume 48, 1045-1049.

Tanaka T., Ohyama M., Morimoto K., Asai F., Iinuma M. (1998). A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Phytochemistry* **48**, 1241-3.

Teissedre P. L., Frankel E. N., Waterhouse A. L. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**, 55-61.

Tiina O. (**2001**). Biological Screening of Plant Coumarins, University of Helsinki (Thesis).

Tjonneland A., Gronbaeck M., Stripp C. , Overvad K. 1999 Wine intake and diet in a random sample of 48,763 Danish men and women. *American J. of Clinical Nutrition*, 69, 49–54.

U

Ulrich S., Wolter F., Stein M. (2005). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis, Mol. Nutr. Food Res., 49, 452 – 461.

Umansky V., Hehner S.P., Dumont A., Hofmann T.G., Schirrmacher V., Droge W., Schmitz M.L. (1998). Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. Eur J Immunol. 28 :2276-82.

V

Vinson J. A., Dabbagh Y. A., Serry M. M. (1995) .Plant flavonoïds, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2800-2.

Vitrac X. , Bornet A. , Vaderlinde R. , Delaunay J.C. , Merillon J.M. ,Tesseidre P.L. (**2005).**Determination of Stilbenes (δ-Viniferin, Trans Astringin, Trans Piceid, Cis and Trans resveratrol, ε-Viniferin) in Brazilian Wines*, j.agric.Food Chem.* 53, 5660- 5669.

Vitrac X. , Castagnino C. , Waffo-Teguo P. , Delaunay J.C., Vercauteren J. , Monti J.P., Deffieux G., Merillon J.M. (2001). Polyhenols Newly extracted in Red Wine from Southwestern France by Centrifugal Partition Chromatography*, j.agric.Food Chem.*, 49, 5934-5938.

Vitrac X., Monti J. P., Vercauteren J., Deffieux G., Mérillon J. M. (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 21687, 1-8.

W

Wade N., (2006). "Red Wine Ingredient Increases Endurance, Study Shows". *New York Times*.

Waffo-Téguo P., Lee D., Cuendet M., Mérillon J. M.,Pezzuto J. M., Kinghorn A. D. (2001). Two new stilbene dimer glycosides from grape (*Vitis vinifera)* cell cultures. *J.Nat. Prod. 64,* 136-138.

Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. (**2003).** Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. *J.Agric.Food Chem.*, *51*, 7989-7994.

Waterhouse A. L., Lamuela-Raventos R. M. (1994). the occurrence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries *Phytochemistry*, *37*, 571-573.

Waterhouse A.L (1995). Wine and Heart disease. *Chemistry & Industry*, 338-341.

Weinges K. , Piretti M. (1971). Isolation of procyanidins B1 from grapes. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **748**, 218-20.

Willett W.C. (1993). Diet and Health : What should we eat ? *Science*, **264**, 532-537.

Wirasathien L., Pengsuparp T. , Suttisri R., Ueda H., Moriyasu M. , Kawanishi K. (2006). Inhibitors of aldose reductase and advanced glycation end-products formation from the leaves of Stelechocarpus cauliflorus R.E. Fr. Phytomedicine (Epub ahead of print).

Wolter F., Clausnitzer A., Akoglu B., Stein J. **(2002**) . Piceatannol, a Natural Analog of Resveratrol, Inhibits Progression through the S Phase of the Cell Cycle in Colorectal Cancer Cell Lines1 Freya Wolter, J. Nutr. 132:298-302.

Wung B., Hsu M., Wu C., Hsieh C. (2006). Piceatannol upregulates endothelial heme oxygenase-1 expression via novel protein kinase C and tyrosine kinase pathways a Pharmacological Research 53 113–122.

Y

Yamada M. , Hayashi K., Hayashi H., Ikeda S., Hoshino T., Tsutsui K., Tsutsui K., Iinuma M., Nozaki H. (2006). Stilbenoids of Kobresia nepalensis (Cyperaceae) exhibiting DNA topoisomerase II inhibition., 67(3):307-13.

Yang G.X., Zhou J.T. , Li Hu C.Q. (**2005**) **.Anti-HIV Bioactive Stilbene Dimers of** *Caragana rosea,* Planta Med, 71: 569-571.

Yang Y.Z. , Ranz A., Pan H.Z., Zhang Z.N., LIN X.B. Meshnick S.R. (1992). Daphnetin: a novel antimalarial agent with *in vitro* and *in vivo* activity Am. J. Trop. Med. Hyg. 46(1): 15-20.

Yoshiaki T., Ke-Xu Y., Kenji T., Yue-Hua H., Masatake N (2002). Biogenetic reactions on stilbene tetramers from Vitaceous plants. *Tetrahedron***,** 58, 9265-9271.

Z

Zgoda-Pols J., Freyer Alan J., Kilmer Lew B., Porter John R. (2002). Antimicrobial Resveratrol Tetramers from the Stem Bark of Vatica oblongifolia spp.oblongifolia. *j.Nat.Prod.*, 65, 1554-1559.

Zhang L., Jope R. S. (1999). Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells, *Neurobiol. Aging*., 20, 271-278.

6. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES À COMITÉ DE LECTURE

2006

1- H. AMIRA-GUEBAILIA, K. CHIRA, T. RICHARD, M. TEGUICHE, A. FURIGA, X. VITRAC, J.-P. MONTI, J. C. DELAUNAY ET J. M. MÉRILLON : Hopeaphenol: the first resveratrol tetramer in wines from North Africa, *J. of Agricultural and food chemistry*, **2006,** 54, 9559-9564

Communications internationales (orales)

2006

1-H. AMIRA-GUEBAILIA et al. (2006), HPLC coupled with Photodiode array detection for the determination of chemical composition of wines from North Africa., Pultusk, Poland

2006

2- H. AMIRA- GUEBAILIA et al (2006), « Beneficial effects of polyphenols from vitis vinifera », international conference on recent developments in Chemistry and their applications RDCA-01, Sebha, Libya

2006

Communications internationales (Poster)

3- H. AMIRA- GUEBAILIA et al. (2006), Absolute structure determination of a coumarin glycoside from *Vitis vinifera* stalks, 22nd international conference on polyphenols, Manitoba, Canada)

2006

4- H. AMIRA- GUEBAILIA et al (2006), new resveratrol dimers from *Vitis vinifera* stem bark , « international conference on recent developments in Chemistry and their applications RDCA-01, Sebha, Libya

2005

Communications nationales (Posters)

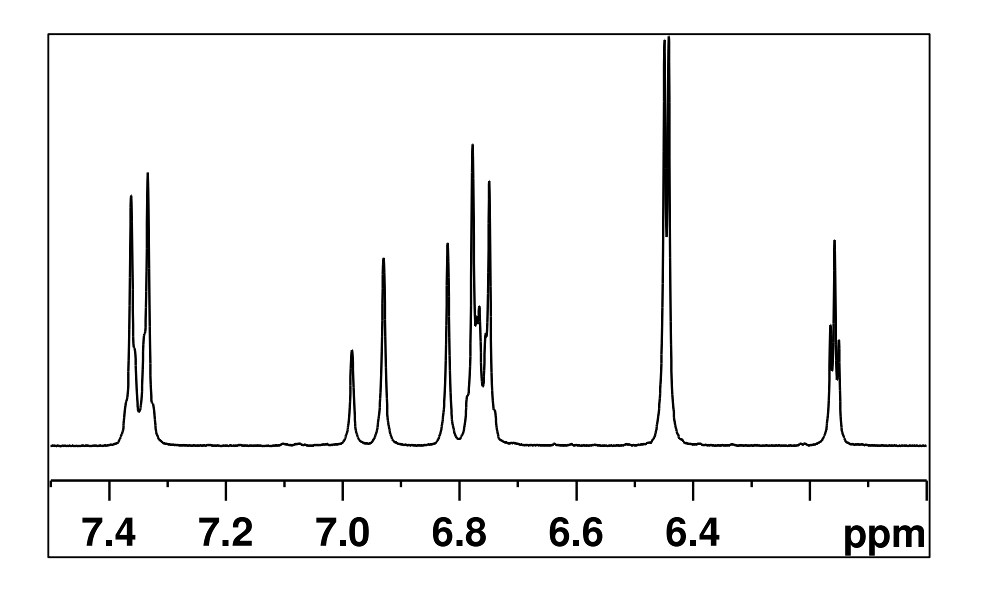
1-H. AMIRA -GUEBAILIA et al. (2005), Grapevine natural defences stimulation by methyl jasmonate, séminaire nationale de la chimie et ses applications, Guelma.

2006

2-H. AMIRA-Guebailia et al. (2006) Anti-inflammatory stilbenes and flavonoids from *vitis vinifera* stem bark, Symposium National de la Chimie Organique, Industrielle et Pharmaceutique " SNCOIP", Annaba

A. ANNEXE SPECTRES RMN ET DE MASSE

***Trans*-resveratrol**



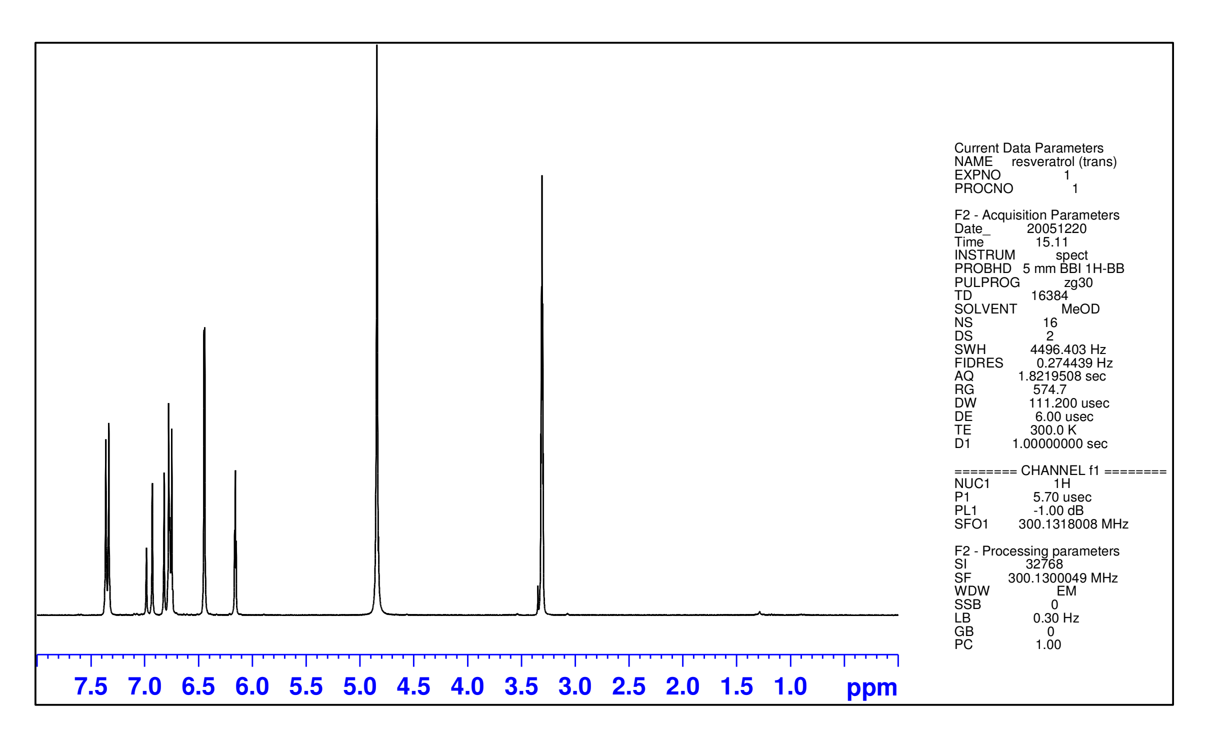
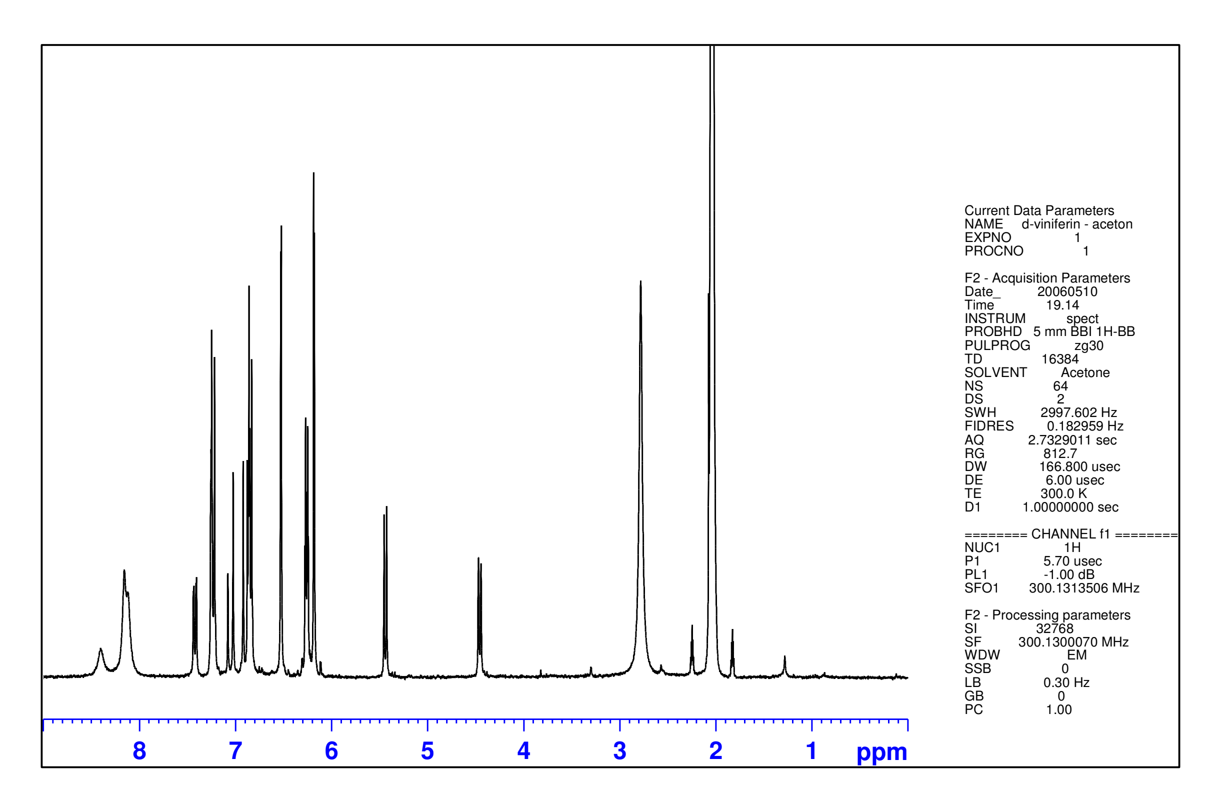


Figure A.1 : Spectre 1H du resvératrol

δ-viniférin



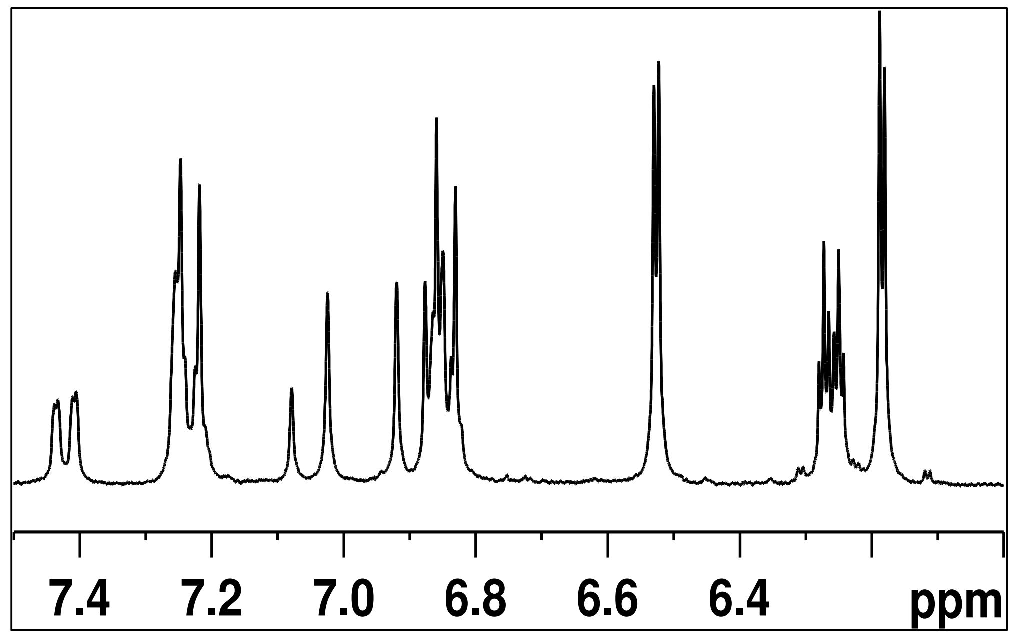
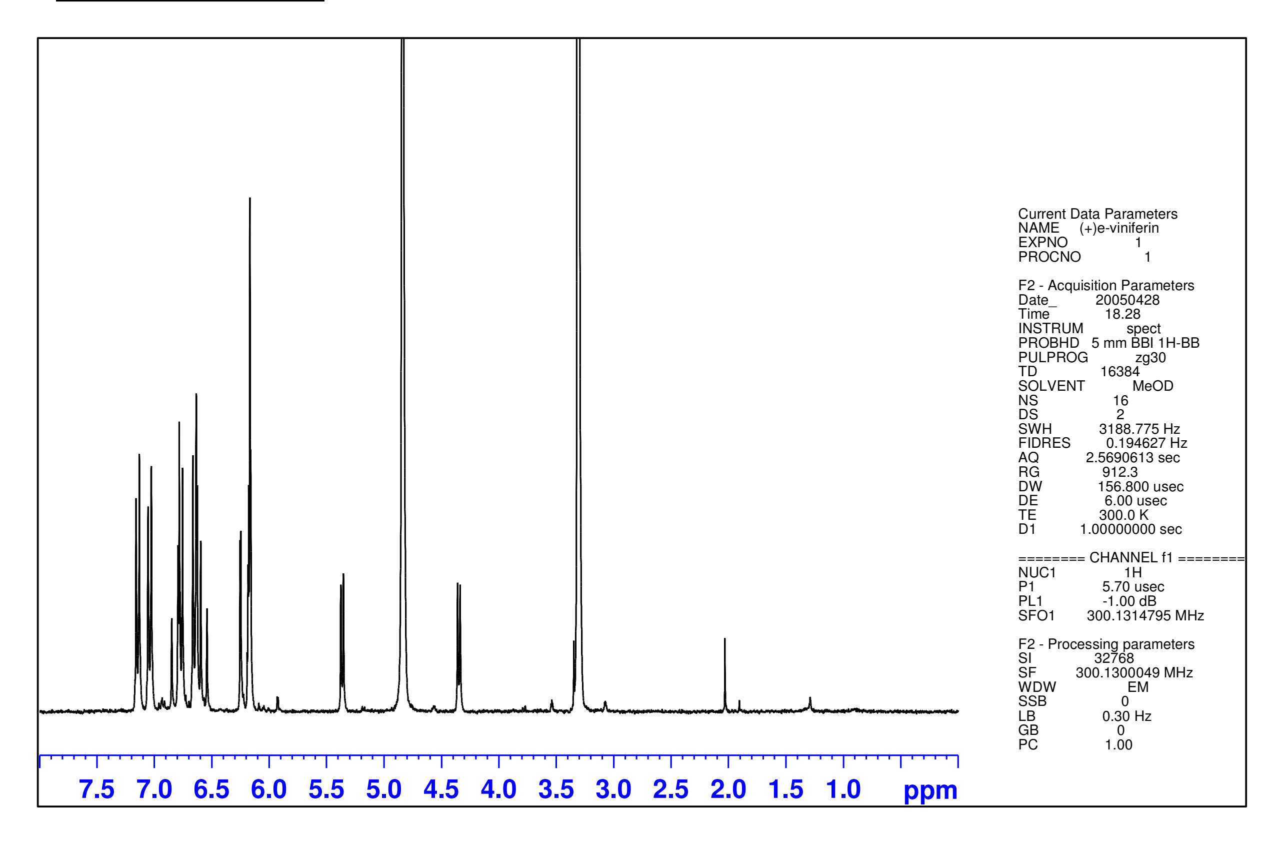


Figure A. 2: Spectre 1H de la δ -viniferin

(+)-Trans-ε-viniférin



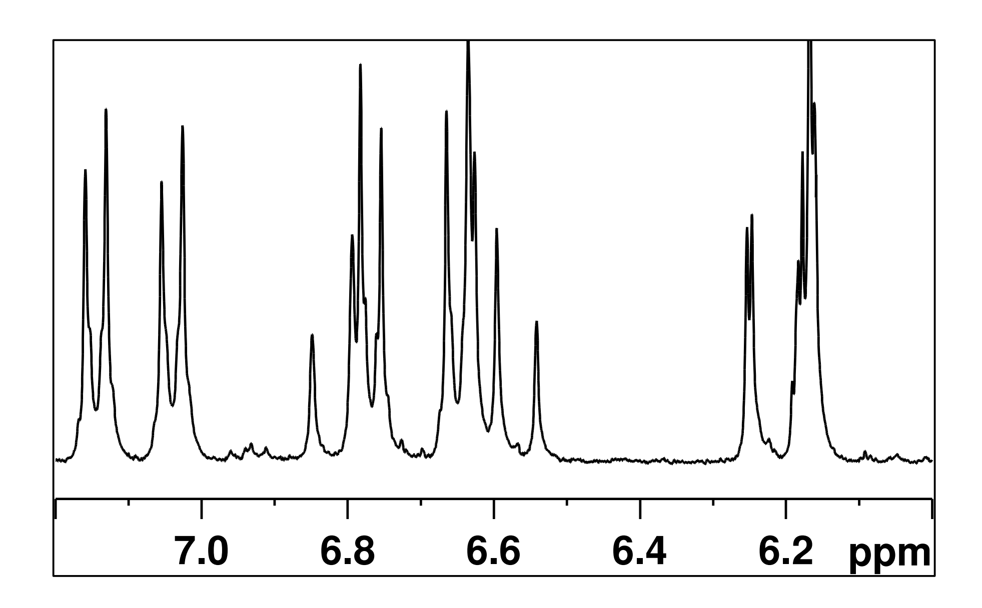


Figure 0.3 : Spectre 1H de la (+) trans ε -viniferin

(-)-Trans-ε-viniférin

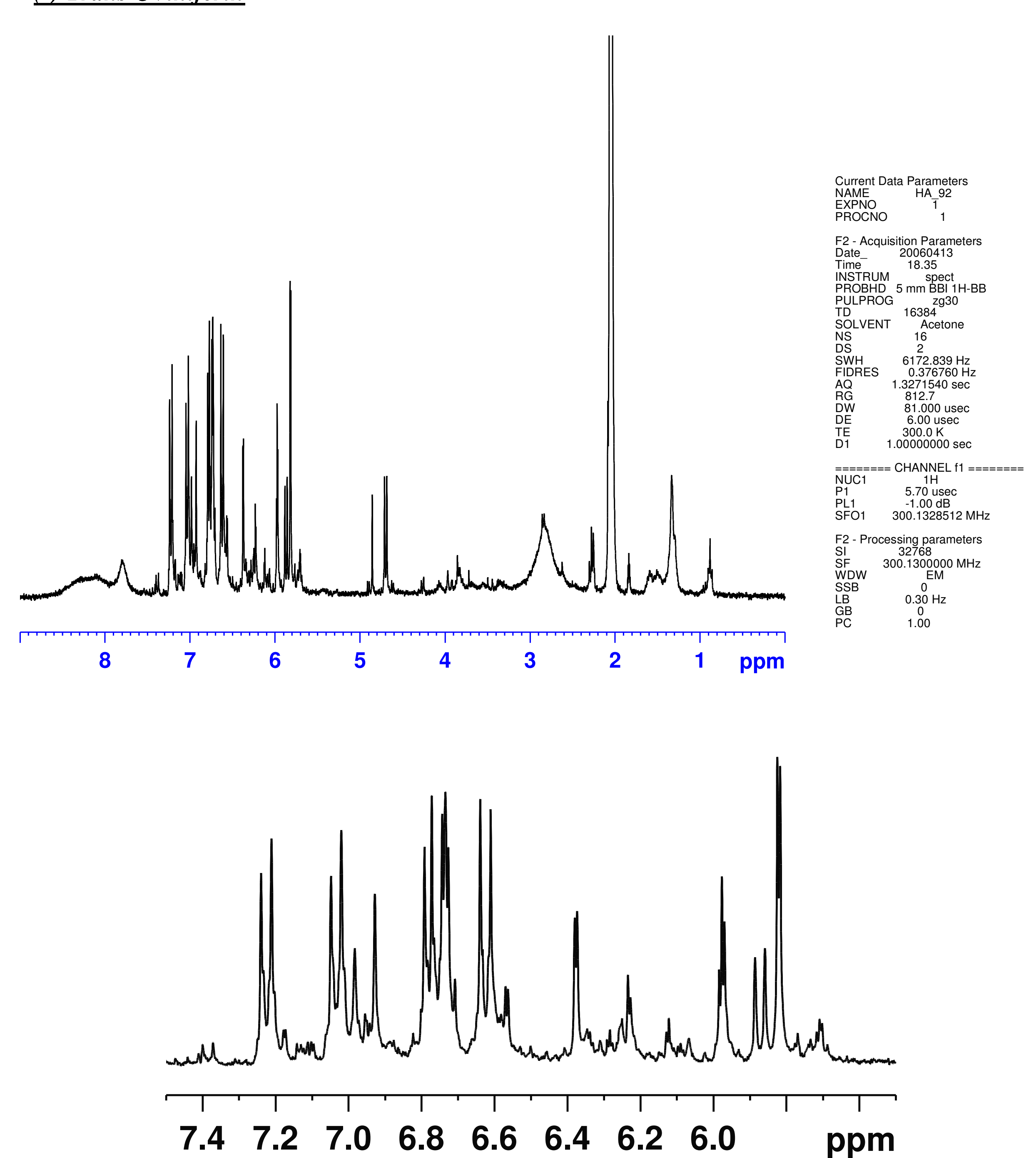
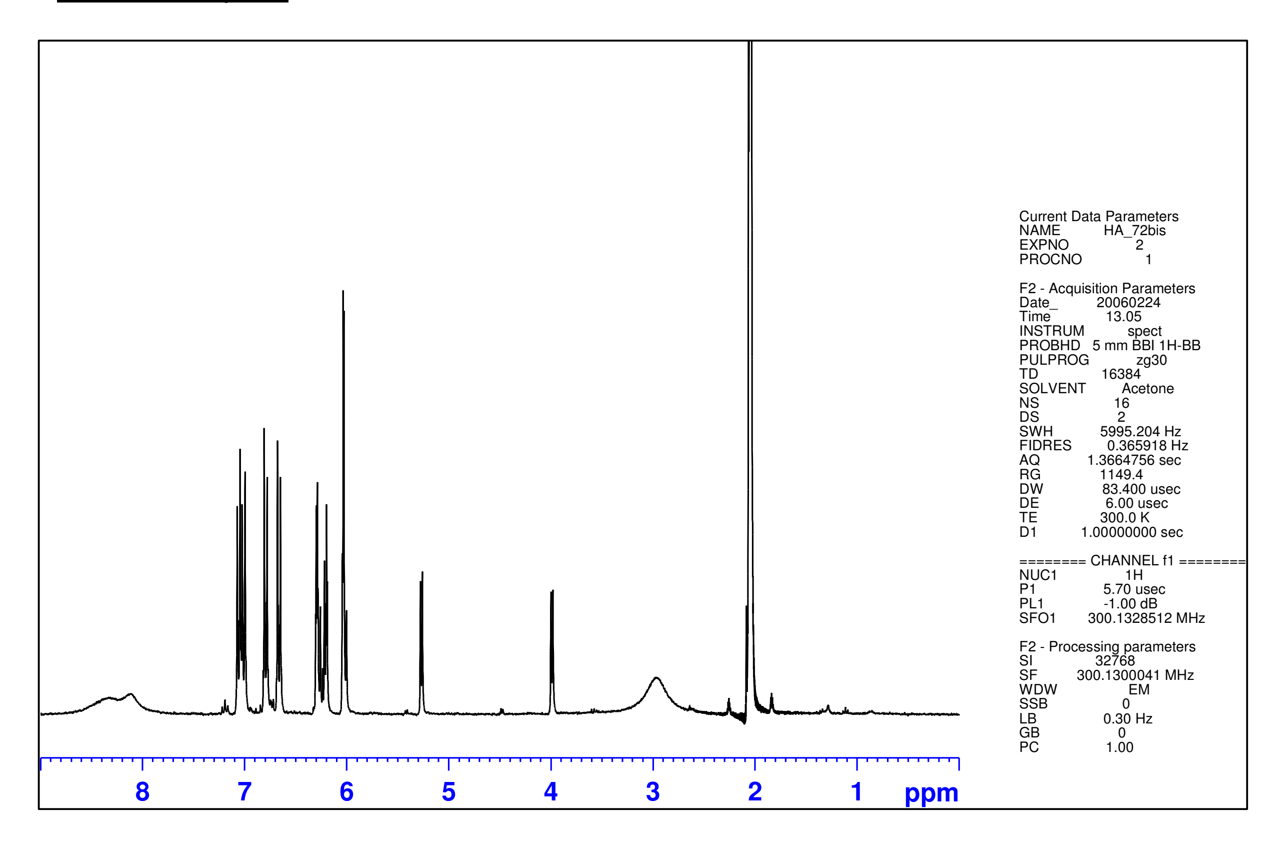


Figure 0.4:Spectre 1H de la (-) trans ε -viniferin

(+)-cis-ε-viniférin



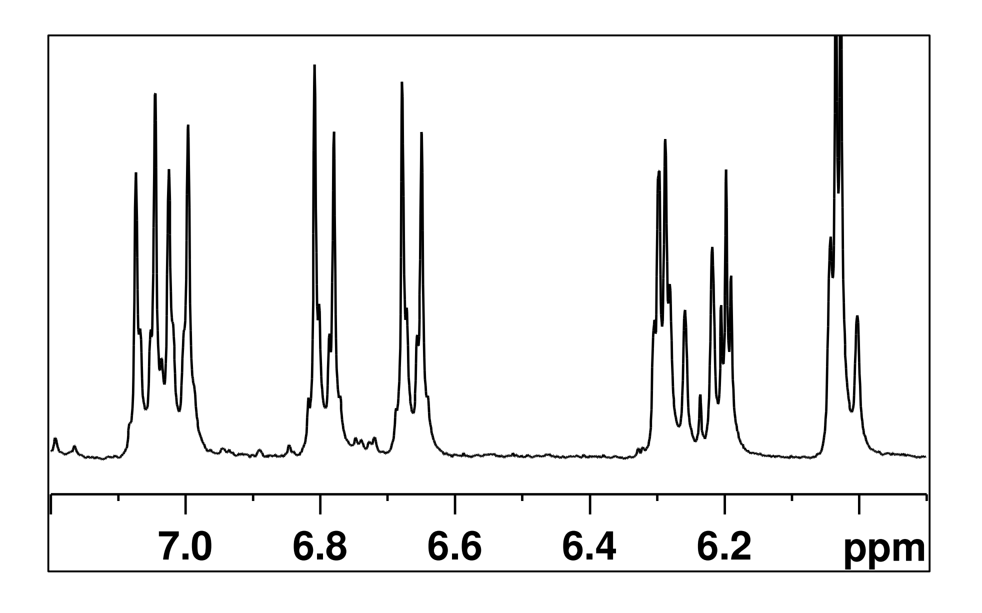
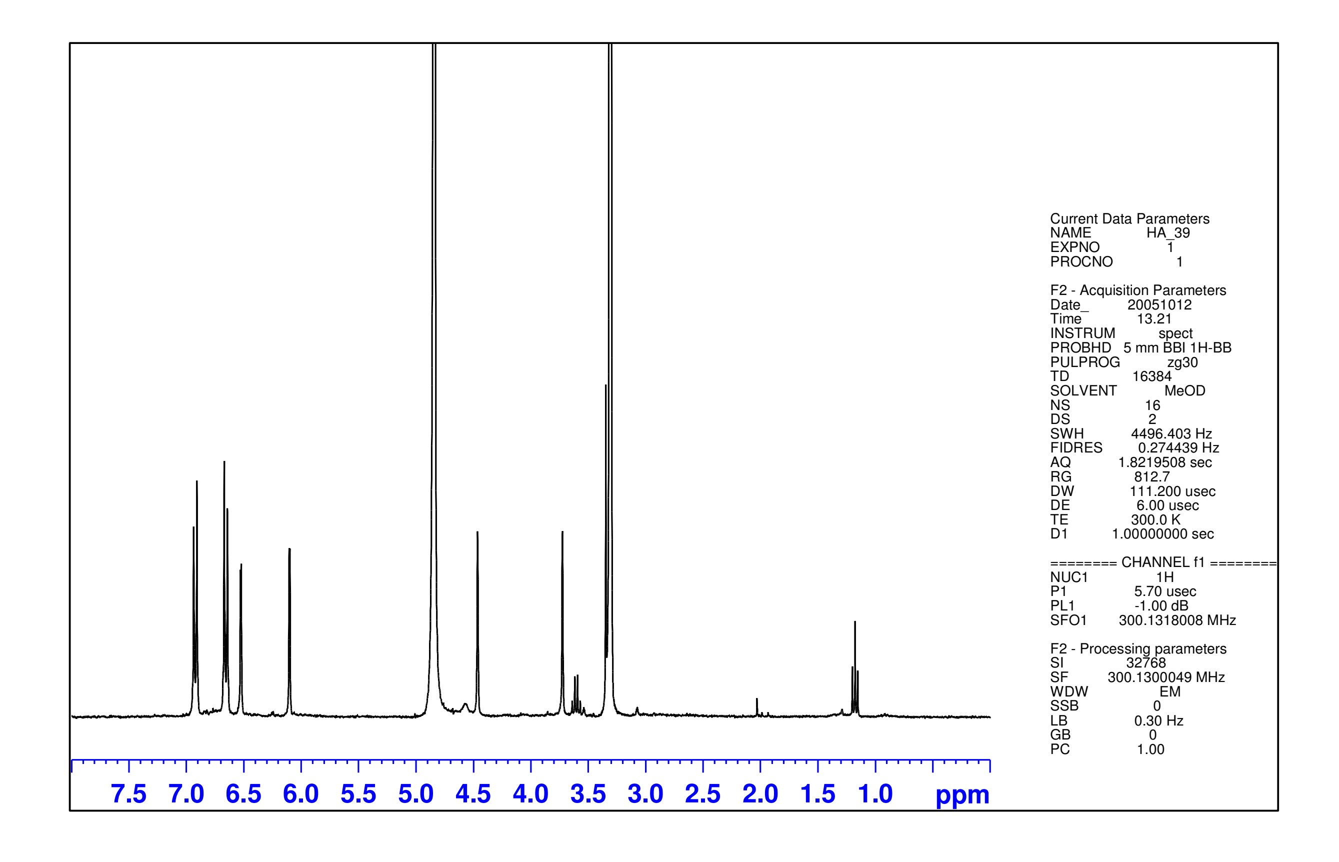


Figure 0.5 : Spectre 1H de la (+) cis ε -viniferin

Pallidol



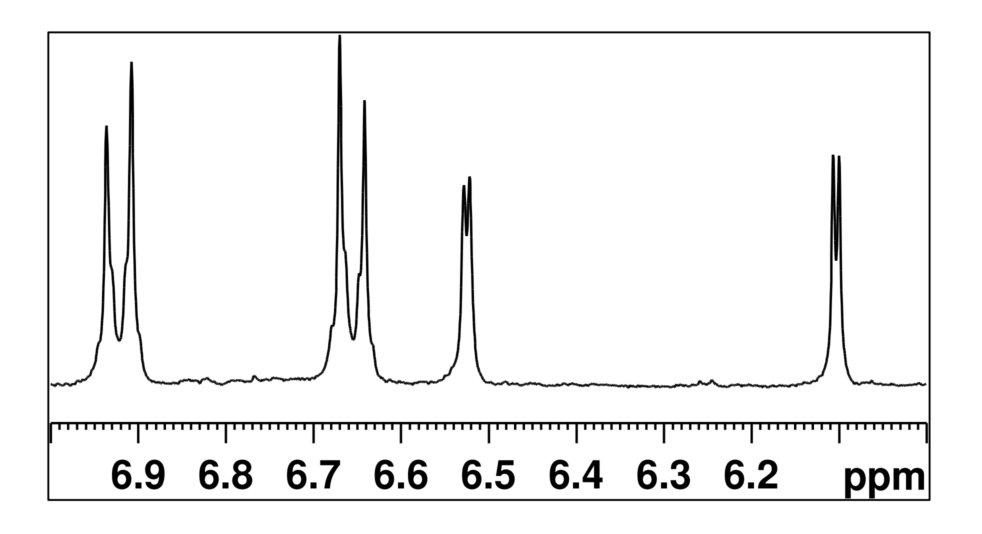
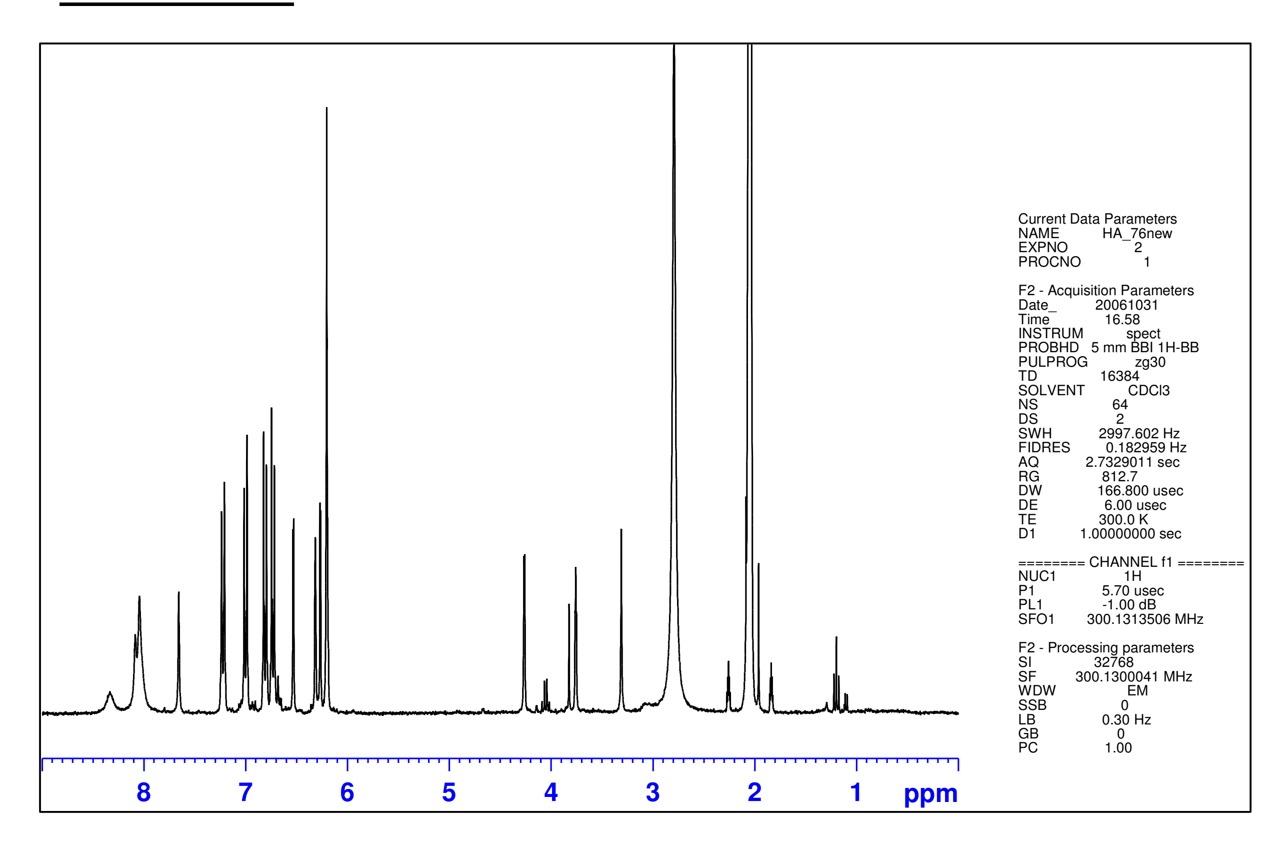


Figure A.6 : Spectre 1H du pallidol

Parthénocissine A



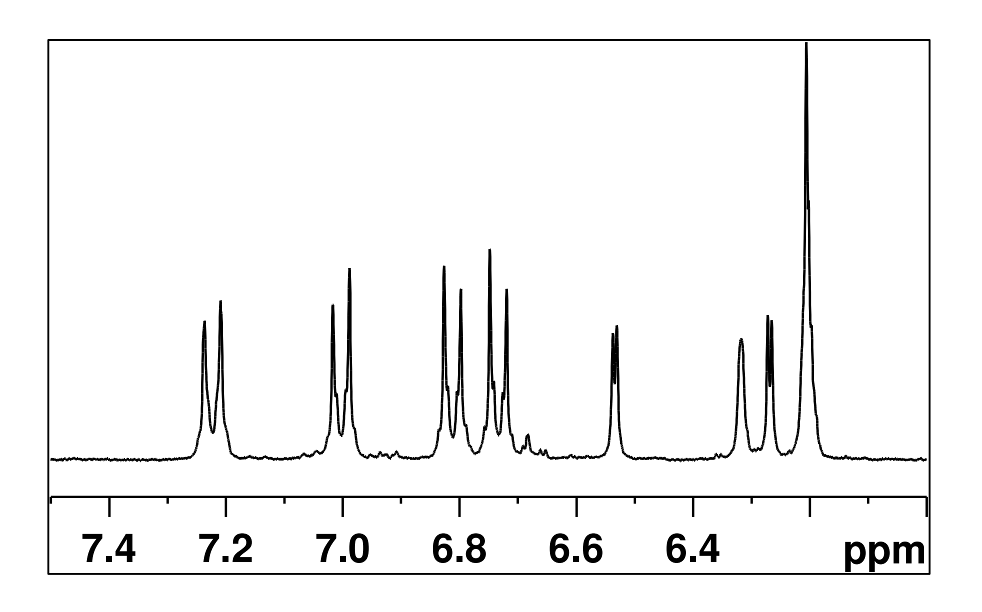
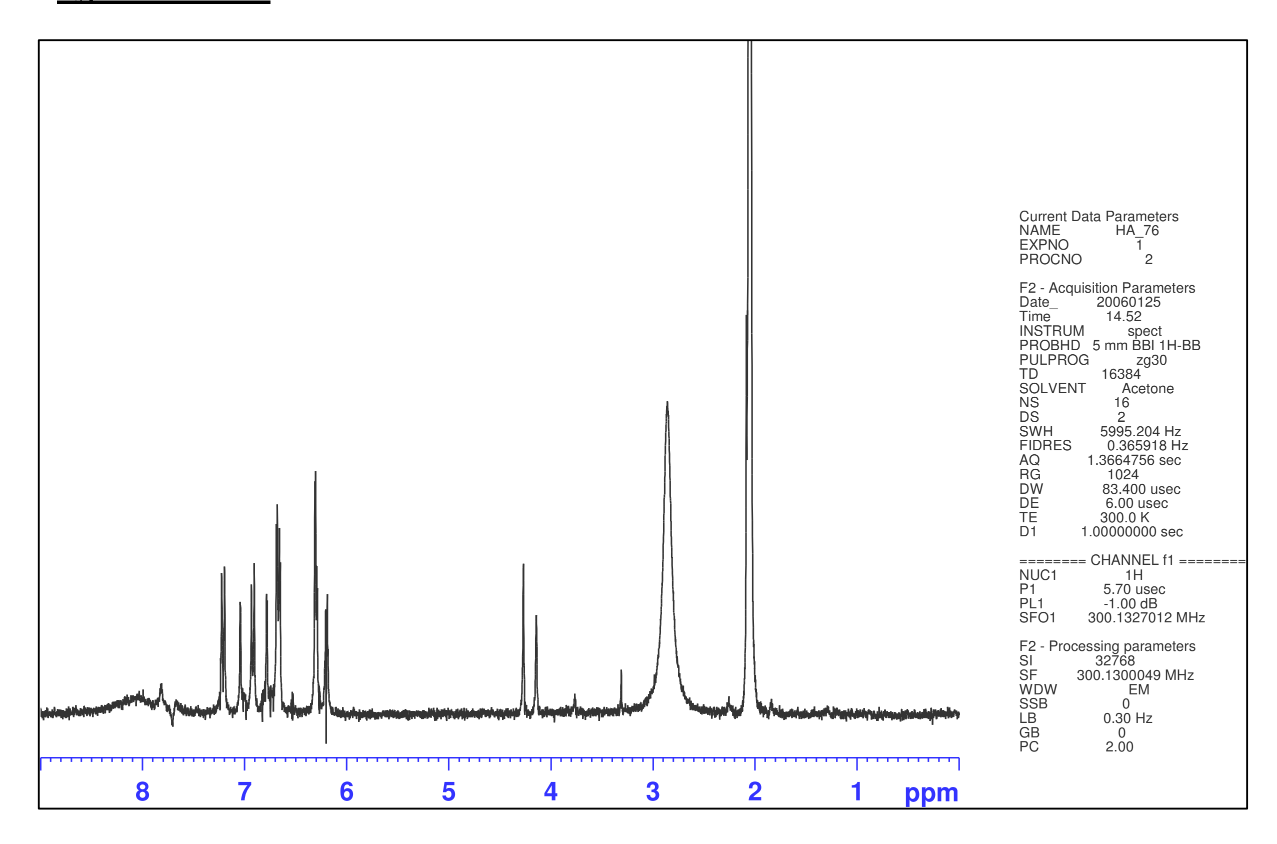


Figure 0.7 : Spectre 1H de la parthénocissine

Cyphostemmin B



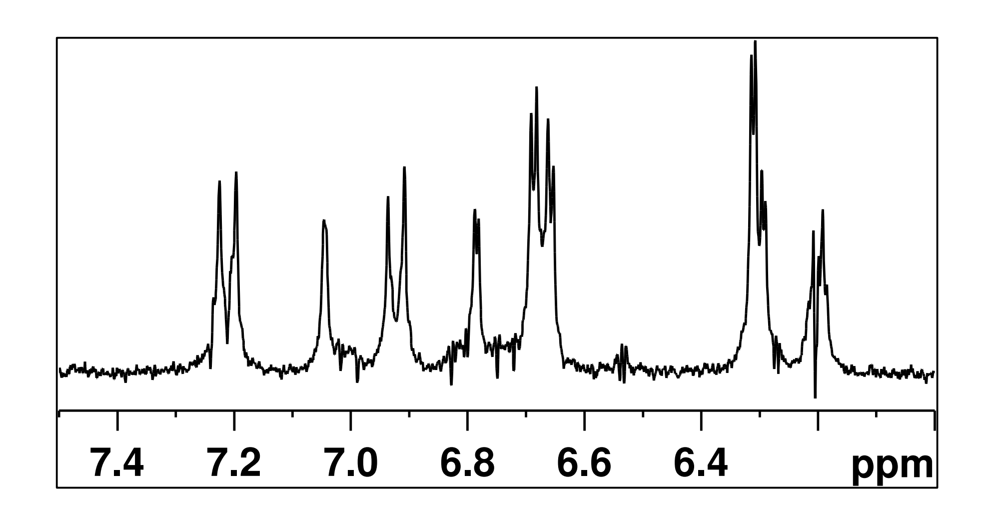
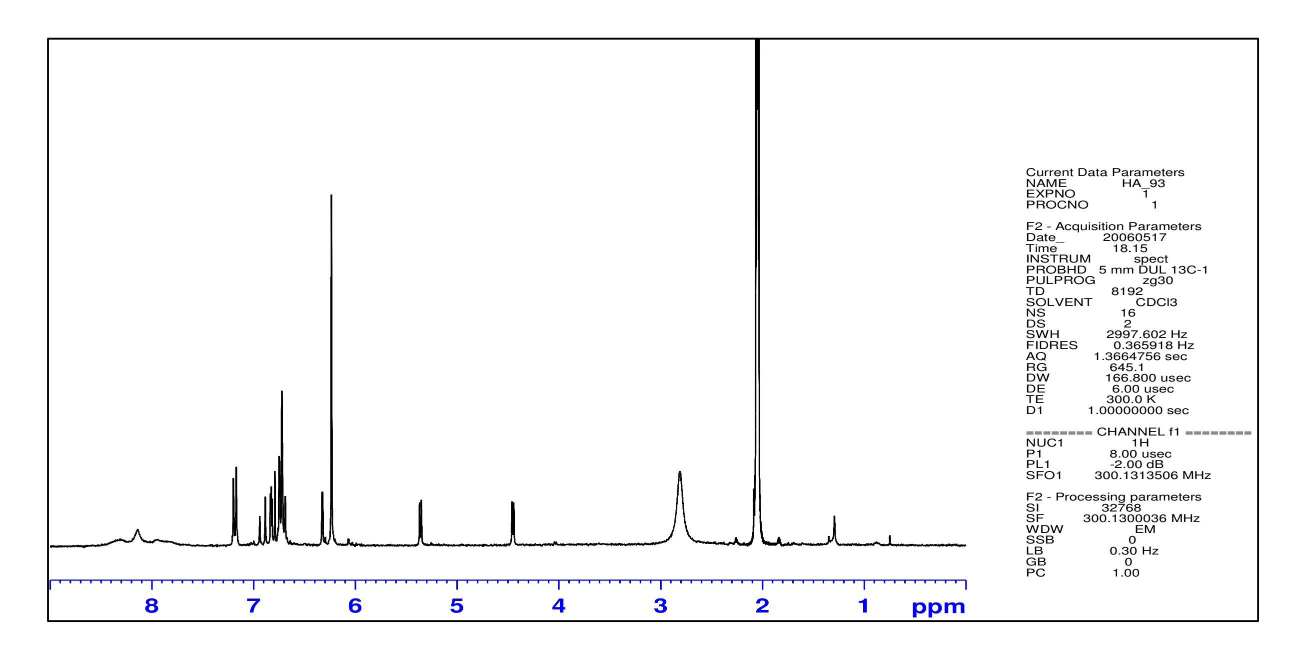


Figure A.8: Spectre 1H de la (+) cyphostemmin

Trans-scirpusin A



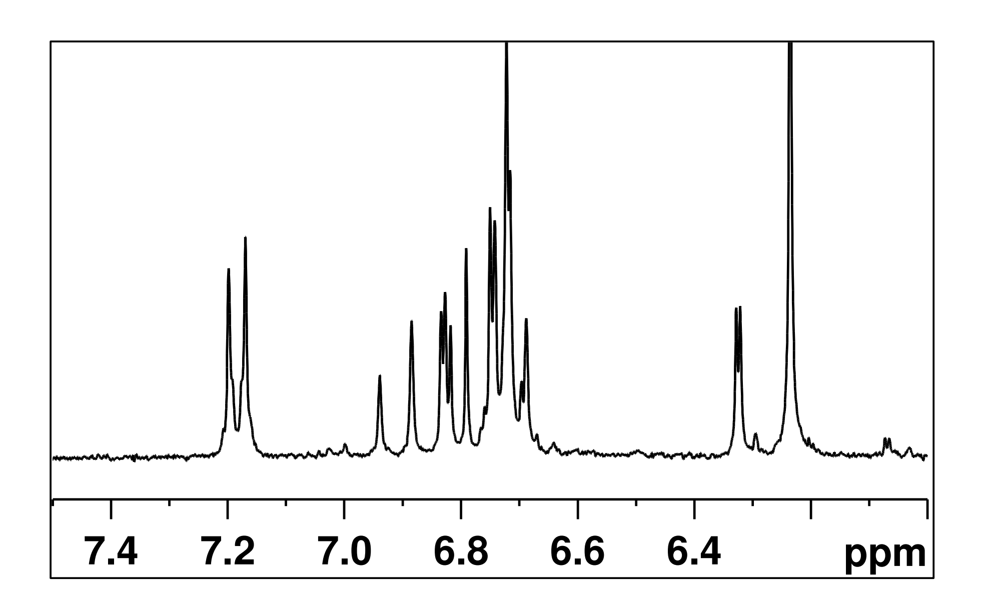
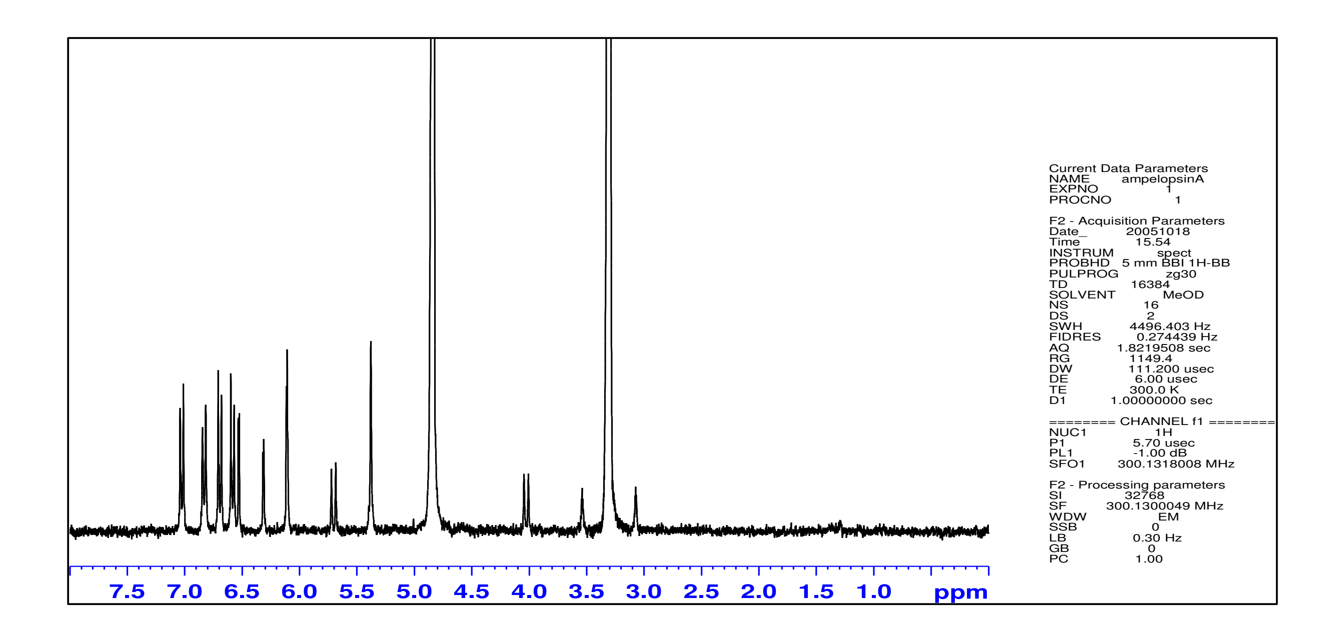


Figure A.9: Spectre 1H de la (+) trans scirpusin A

*(+)-**<u>Ampelopsin A</u>***



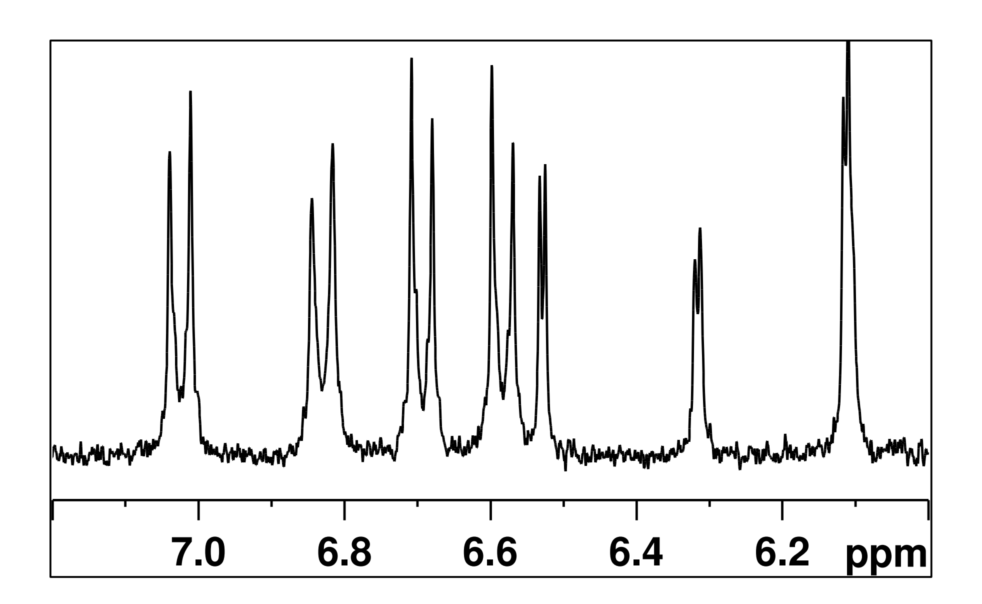
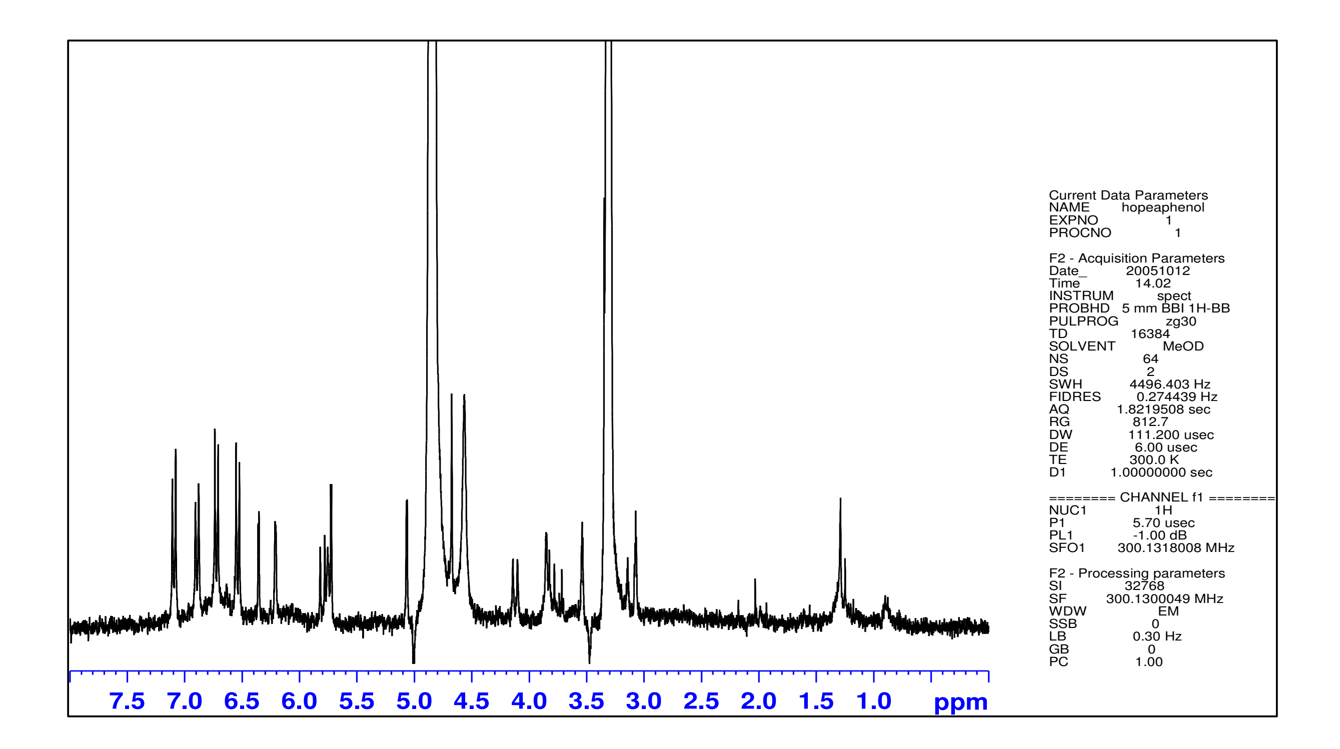


Figure 0.10 : Spectre 1H de l'ampelopsin A

(+)-Hopéaphénol



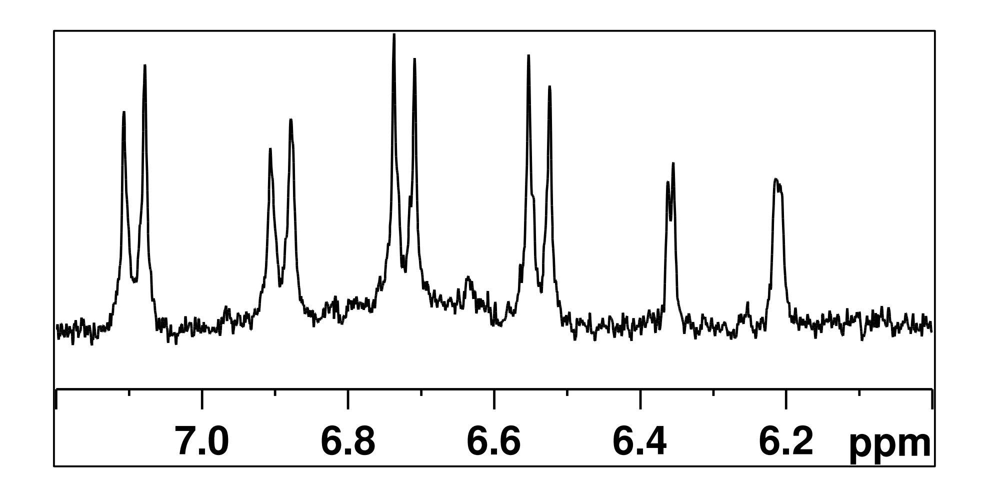
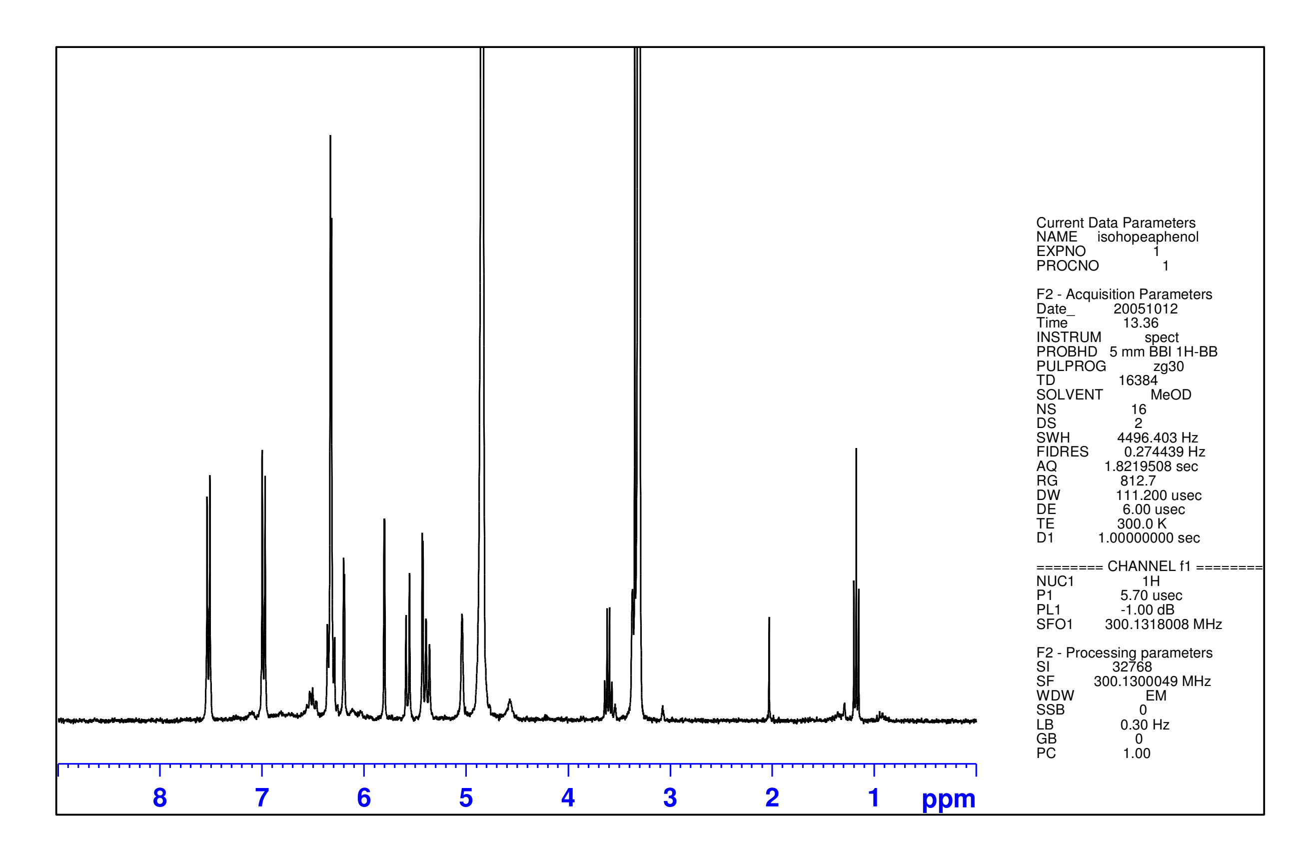


Figure A.11 : Spectre 1H de l'hopéaphénol

(-)-isohopeaphenol



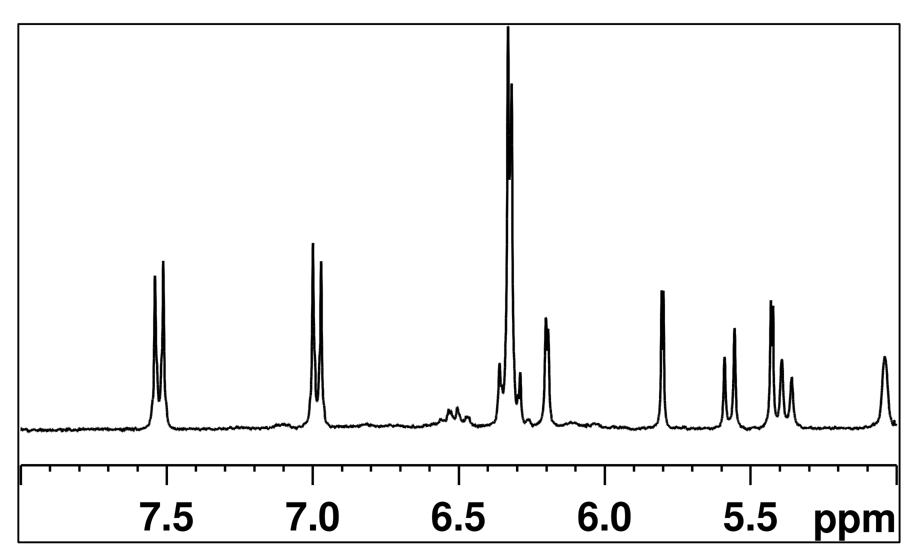


Figure A.12: Spectre 1H de l'isohopéaphénol

Nepalensinol B

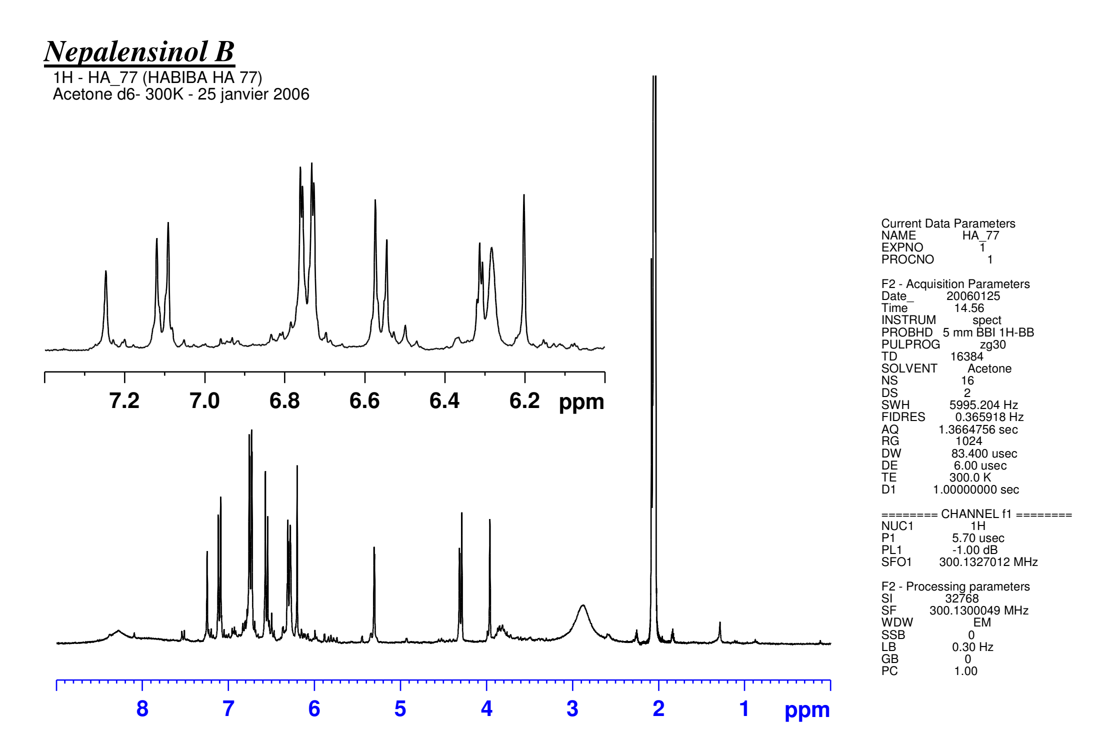
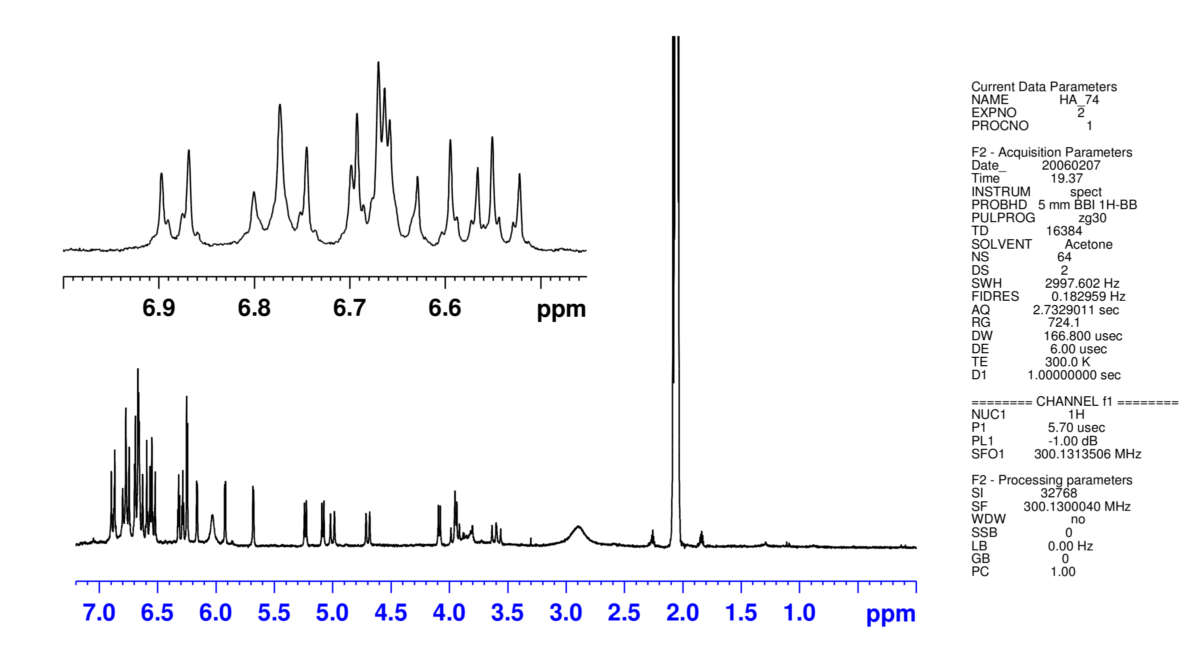


Figure A.13: Spectre 1H du nepalensinol

Viniferol E

a)



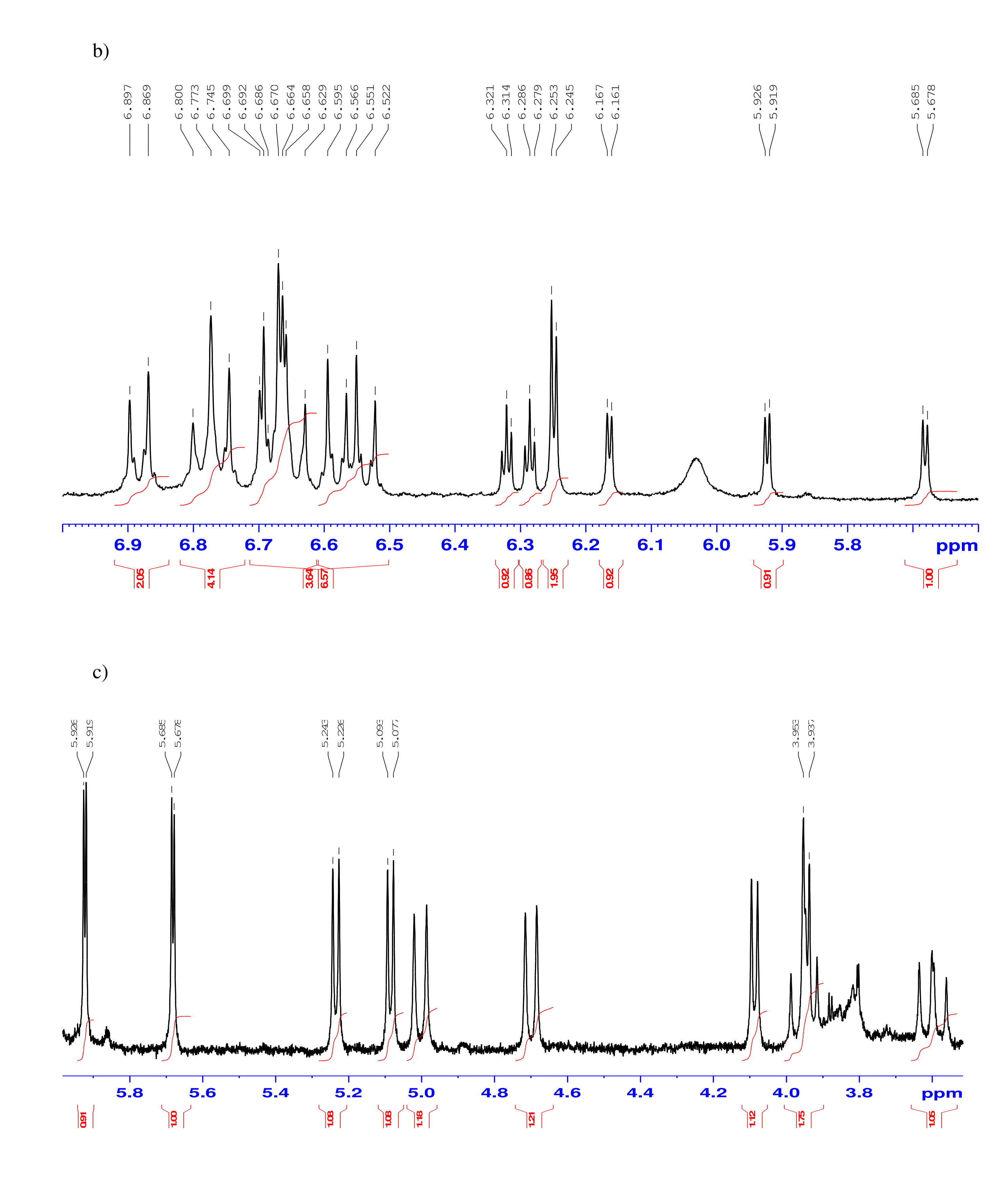
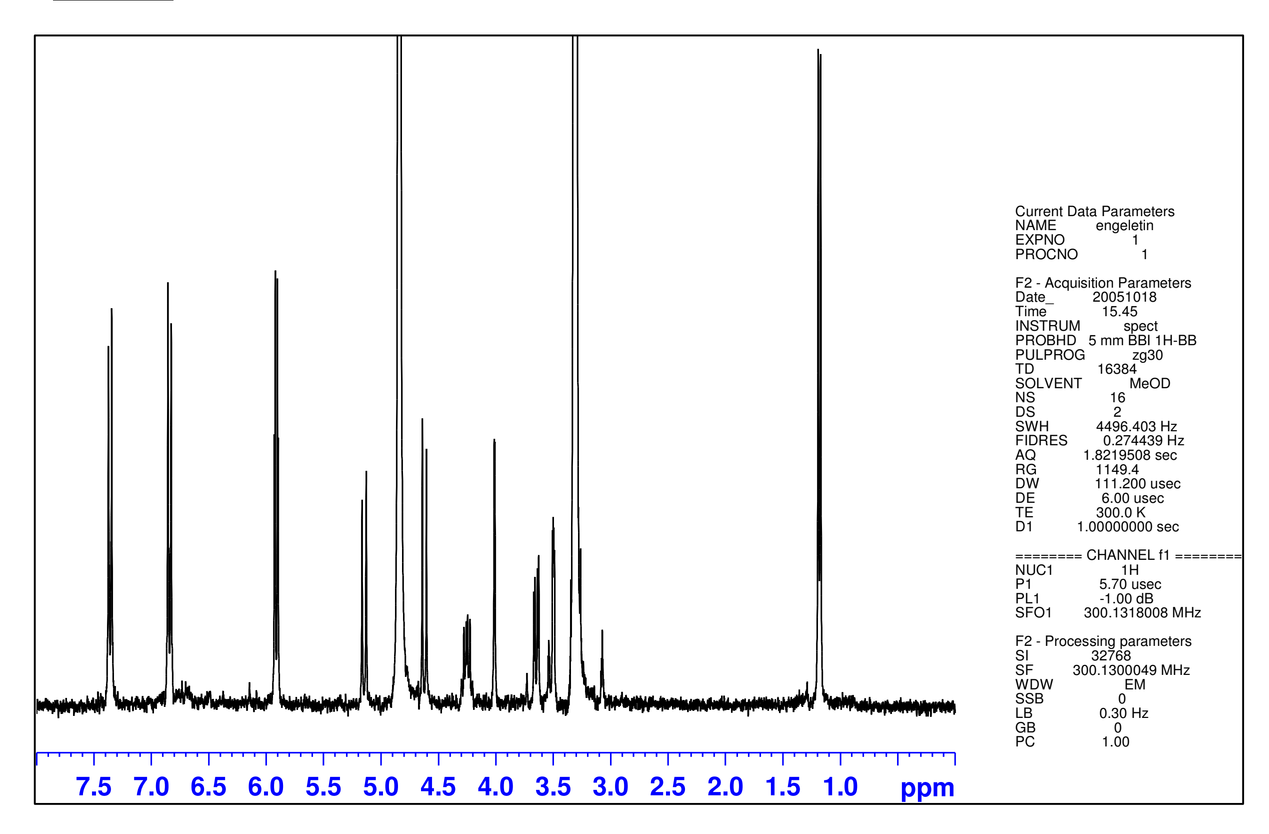


Figure A.14 : Spectres 1H du viniferol E

Engeletin



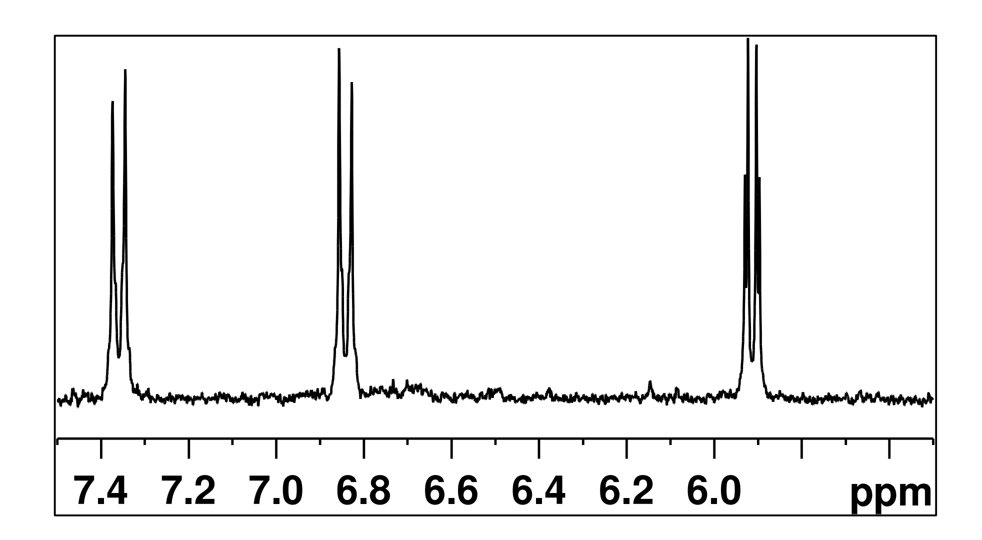


Figure A.15: Spectre 1H de l'engeletin

SPECTRES DE MASSE

Vi iferol E

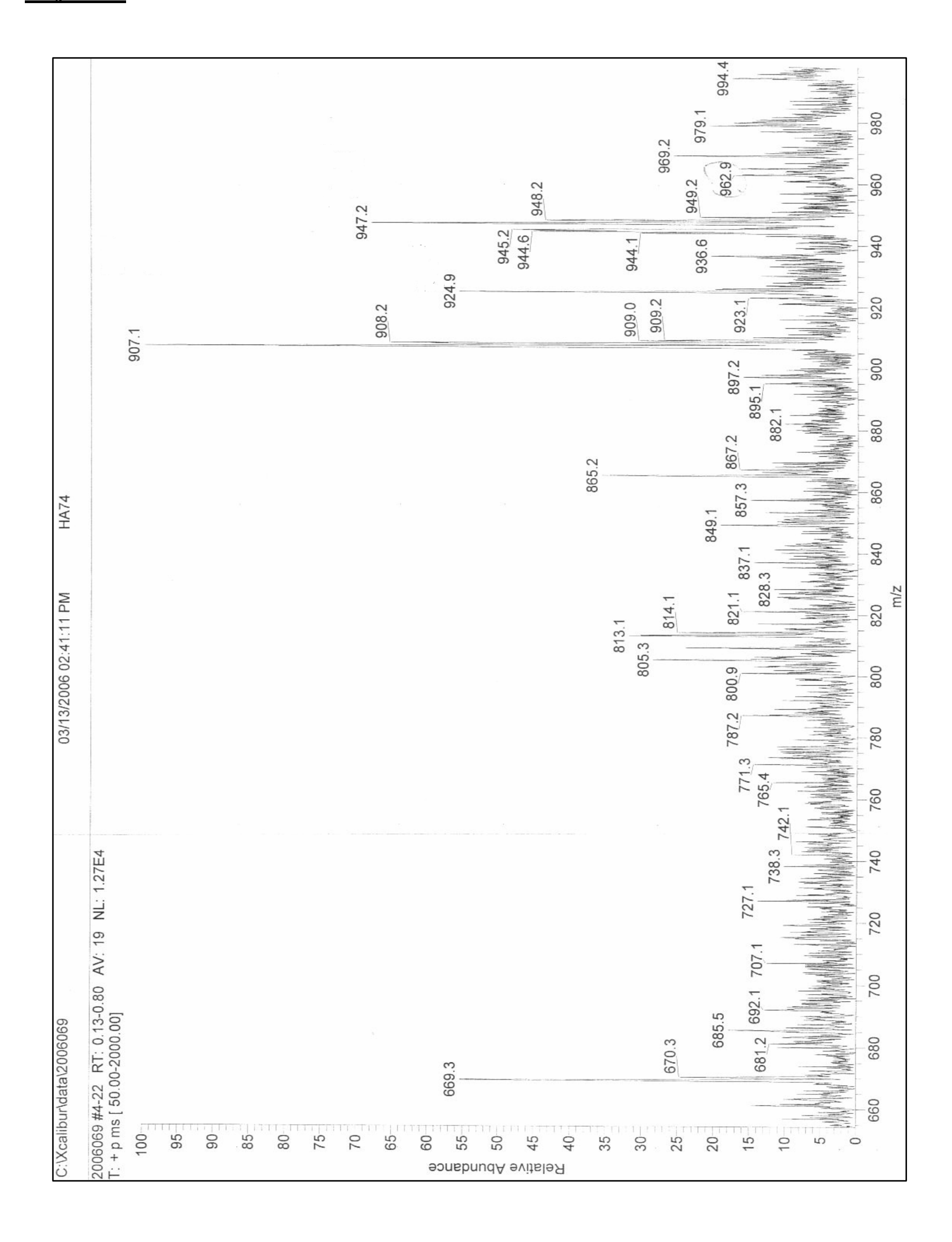


Figure 0.16 : Spectre de masse du composé HA74

Composé HA69 (isomère ampelopsin A)

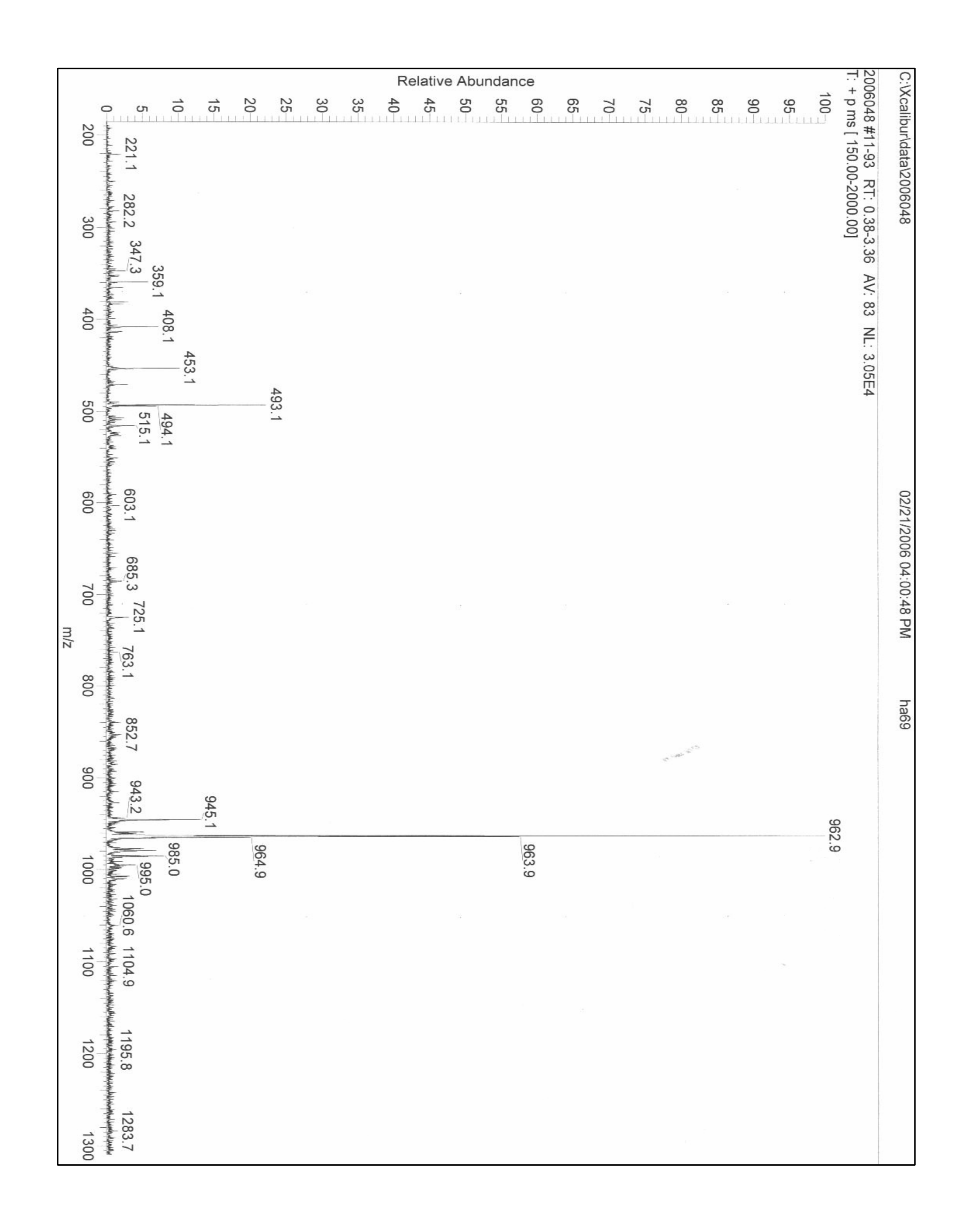


Figure A.17: Spectre de masse du composé HA69

<u>Ampelopsin A(HA63)</u>

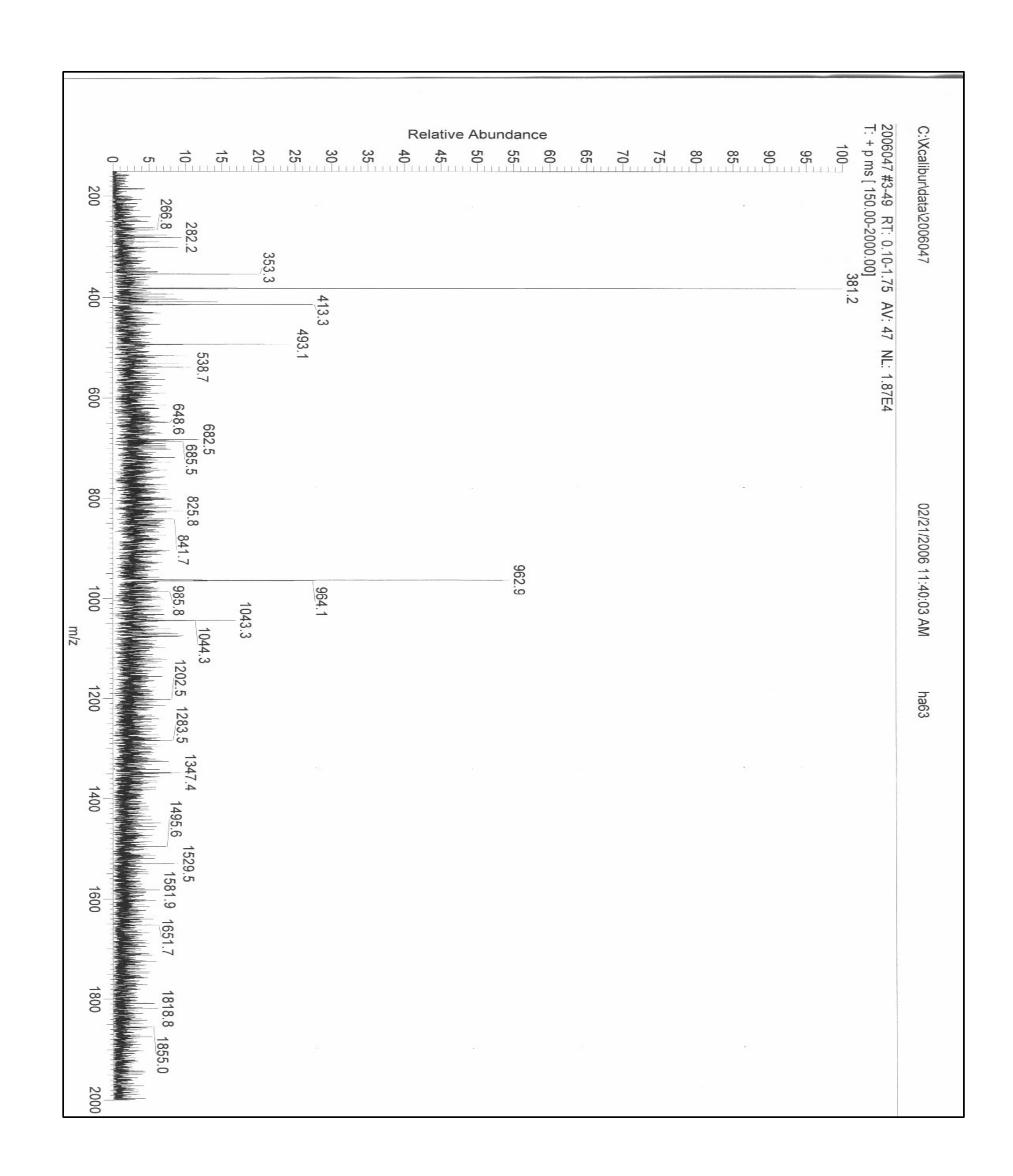


Figure A.18 : Spectre de masse du composé HA 63 (Ampelopsin A)

<u>Hopéaphénol</u>

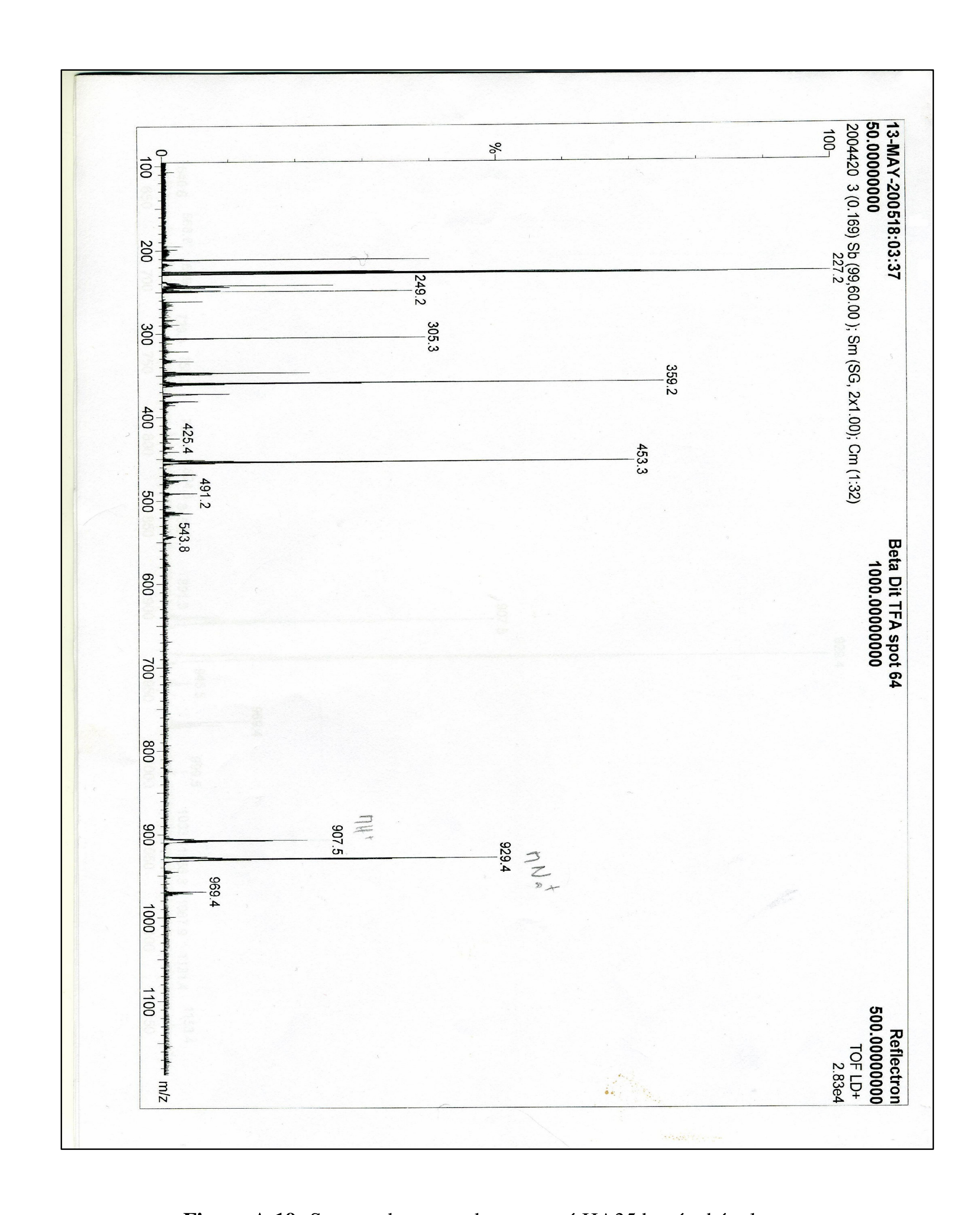


Figure A.19: Spectre de masse du composé HA35 hopéaphénol

(-) *trans* ε-viniférine

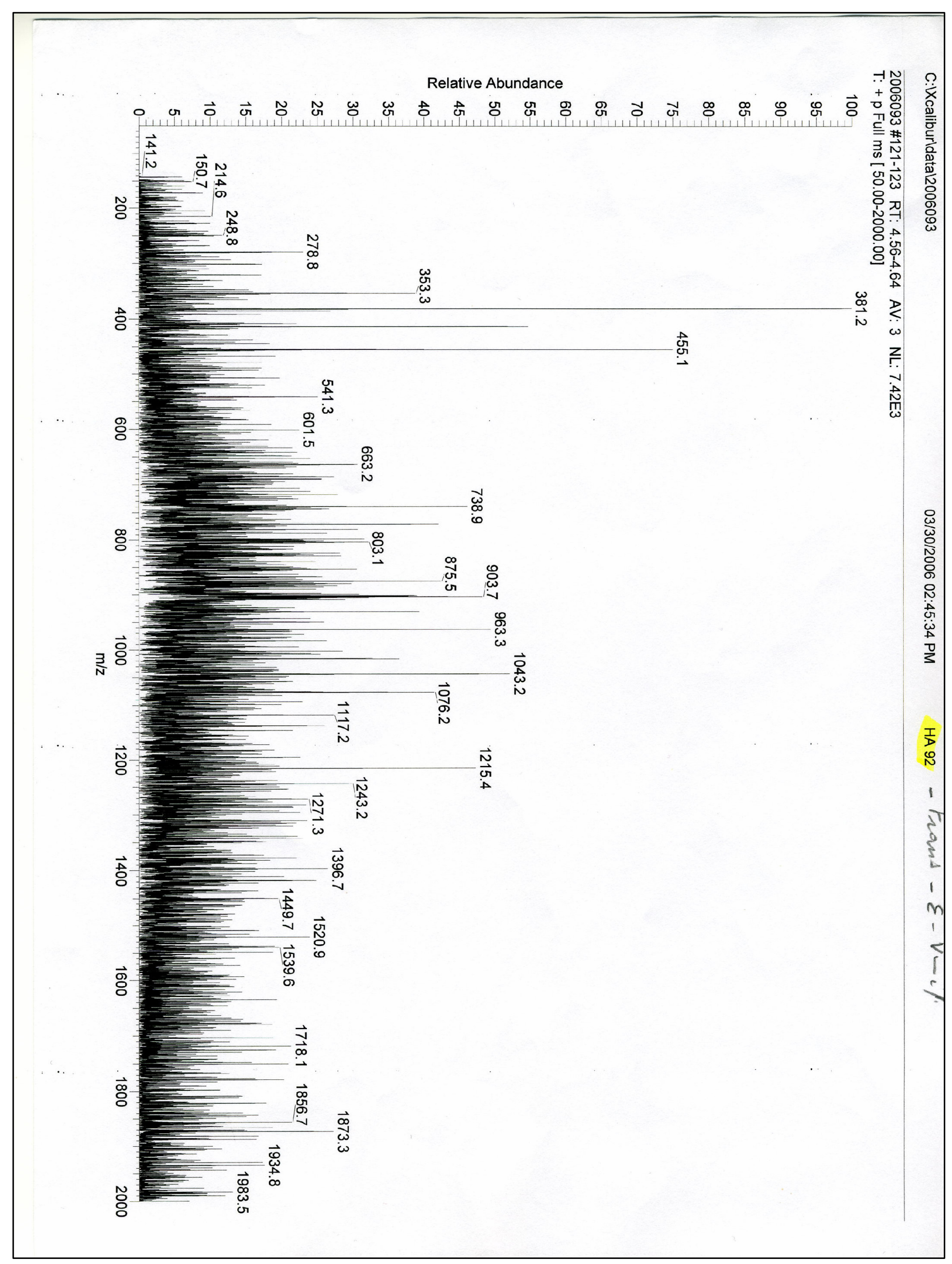
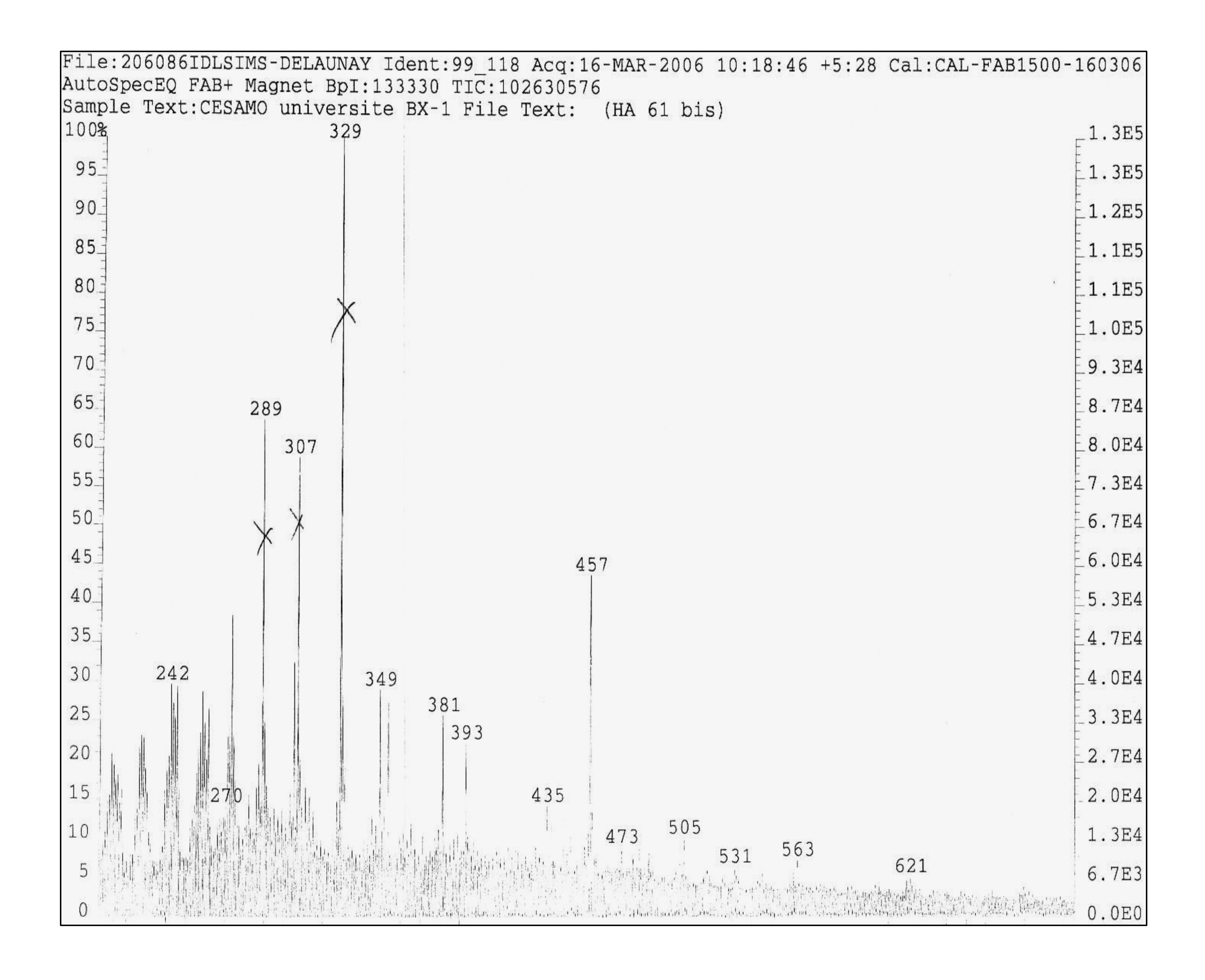


Figure A.20:Spectre de masse de la (-) ε-viniférine

<u>Engeletin (HA 61bis)</u>



File:206086IDLSIMS-DELAUNAY Ident:99_118 Acq:16-MAR-2006 10:18:46 +5:28 Cal:CAL-FAB1500-160306
AutoSpecEQ FAB+ Magnet BpI:133330 TIC:102630576
Sample Text:CESAMO universite BX-1 File Text: (HA 61 bis)
329
289
307
457
242
349
381
393
270
435
473
505
531
563
621

Figure A.21: Spectre de masse du composé HA61 bis (Engeletin)